

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

**Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

# Sphingosin als potentielle Prophylaxe im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sascha d'Almeida  
aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Kupatt
Mitberichterstatter:	PD. Dr. Heiko Methe
	Prof. Dr. Markus Rehm
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Tilman Ziegler
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	25.10.2018

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	6
1.1	Das Krankheitsbild der Sepsis: Überblick, „alte“ und „neue“ Definitionen .....	6
1.1.1.	Asepsis und Antisepsis .....	7
1.1.2.	Inflammation .....	7
1.1.3.	Antiinflammation, Apoptose und Nekrose .....	7
1.1.4.	SIRS .....	8
1.1.5.	Kontamination und Infektion .....	9
1.1.6.	Definition und weitere Stadien der Sepsis nach Sepsis-2 (Konferenz von 2002) ..	11
1.1.7.	Kritik an der Konsensuskonferenz 2002 und neue Richtlinien der Konsensuskonferenz 2016 (Sepsis-3) .....	14
1.2.	Mensch und Sepsis: Chronik der Krankheit, Erklärungsmuster und Prävention .....	16
1.2.1.	Chronologie der Sepsis .....	16
1.2.2.	Sepsis und Prävention .....	17
1.2.3.	Herausforderungen in der Prävention der Sepsis .....	18
1.3.	Therapie .....	19
1.4.	Immunkompetenz und Sepsis: Studienlage .....	20
1.4.1.	Glucocorticoide .....	22
1.4.2.	5-HT7 Antagonismus .....	22
1.5.	Sepsis und kardiovaskuläre Dysfunktion .....	22
1.5.1.	L-Name .....	22
1.5.2.	Esmolol .....	23
1.6.	Diagnostische Laborparameter in der Sepsis: Studienlage .....	23
1.7.	Die Rolle der mikrovaskulären Stabilität .....	24
1.7.1.	Angiopoietin 2 (Ang 2) .....	24
1.7.2.	Das Thymosin Beta 4 System (Tβ4) .....	24
1.8.	Beeinflussung der vaskulären Strukturintegrität .....	25
1.8.1.	Morphologie des Gefäßes: endotheliale und vaskuläre Dysfunktion .....	25
1.8.2.	Definition von Permeabilität .....	26
1.8.3.	VEGF und Tsad: Konsequenzen einer Tsad Mutation .....	28
1.9.	Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und das Sphingolipidsystem (S1P/SPH/CER/C1P) ....	34
1.9.1.	Synthese und Stellenwert der Sphingolipide .....	34
1.9.2.	S1P: Rezeptoren, Signalwege und Funktionen .....	39
1.9.3.	Probleme und Herausforderungen des S1P .....	43
1.9.4.	Synthetische S1P Analoga .....	45
1.10.	Fragestellung .....	46
2.	Versuchsaufbau, Material und Methoden .....	47
2.1.	Mäuse .....	47
2.2.	Versuchsbeschreibung und Sepsis-Severity-Score .....	47
2.3.	Methoden in vivo .....	50
2.3.1.	Nicht invasive Blutdruckmessung: Das Coda Blutdrucksystem .....	50
2.3.2.	Zwei-Photonen Mikroskopie .....	51
2.3.3.	Echokardiographie .....	52
2.4.	Methoden ex vivo .....	54
2.4.1.	Organentnahme und Aufbereitung .....	54
2.4.2.	Mikroskopieren der Schnitte .....	55
2.4.3.	PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	56
2.4.4.	IL-6 ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay .....	57
2.4.5.	Messung der LPS induzierten Aktivität verschiedener Leukozytenpopulationen anhand von MACS und FDG .....	60
2.5.	Material und Regressionsverfahren .....	62
2.5.1.	Chemikalien .....	62

2.5.2. Histologie.....	62
2.5.3. Operationszubehör / Tierhaltung .....	63
2.5.4. Geräte .....	63
2.5.5. Software .....	65
2.5.6. Kits .....	65
2.5.7. Zellkultur.....	65
2.5.8. Primer.....	66
2.5.9. Antikörper .....	66
2.6. Statistik .....	67
3. Ergebnisse .....	68
3.1. qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	68
3.1.1. qPCR des Herzwesbes .....	68
3.1.2. qPCR des Nierengewebes .....	71
3.2. Der Sepsis Severity-Score .....	72
3.2.1. Gewichtsverlust .....	72
3.2.2. Verhalten.....	73
3.2.3. Gesamtscore .....	74
3.3. Echokardiographie .....	75
3.4. Zwei Photonen Mikroskopie .....	79
3.5. Histologie.....	80
3.5.1. Ergebnisse im Herzmuskel .....	80
3.5.2. Ergebnisse im Skelettmuskel.....	82
3.5.3. Verlaufanalyse anhand des Beipfels der Perizyten im Herzen .....	83
3.5.4. Die Rolle des PC/EC-Quotient.....	85
3.6. Blutdruck.....	85
3.6.1. Zeitliche Entwicklung des Blutdrucks .....	85
3.7. Überlebenswahrscheinlichkeitskurve .....	88
3.8. ELISA .....	89
3.8.1. IL-6 Konzentration als Funktion der Zeit .....	90
3.9. Pilotexpeimente .....	91
3.9.1. Glatte Muskelzellfärbung .....	91
3.9.2. Messung der FDG Aktivität in verschiedenen Leukozytenpopulationen nach MACS.....	91
4. Diskussion: Zusammenfassung, abschließende Wertung und Ausblick.....	95
4.1. Zusammenfassung .....	95
4.1.1. Methoden im Mausmodell.....	96
4.2. Methoden und Ergebnisse.....	99
4.2.1. Analyse der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Sepsis-3-Richtlinien.....	100
4.2.2. Diskussion und Entwicklung des Blutdrucks .....	100
4.2.3. Die Remission .....	103
4.2.4. ELISA.....	103
4.2.5. Zwei Photonen Mikroskopie.....	104
4.2.6. MACS und FDG-Aktivität.....	104
4.3. Ansätze für zukünftige Forschung.....	105
4.3.1. Histologie.....	105
4.3.2. Echokardiographie als Früherkennung .....	106
4.3.3. qPCR.....	106
4.3.4. Restitutio oder Reparatio .....	106
4.4. Abschließende Wertung.....	107
4.4.1. Bedeutung außerhalb der Spezies Maus .....	107
4.4.2. Die Genetik als Wegweiser für eine individualisierte Therapie der Sepsis .....	107
4.4.3. Übertragung auf den Menschen .....	108
4.4.4. S1P und die Therapie des Menschen .....	109
4.4.5. Ausblick: Die Sepsis und S1P.....	109

Abkürzungsverzeichnis.....	111
Literaturverzeichnis .....	113
Abbildungsverzeichnis.....	123
Tabellenverzeichnis.....	125
Anhang.....	126
Blutdruckmessung mit Coda (23.05.2013).....	126
Pecam NG <sub>2</sub> Färbung .....	126
Mouse: Pecam/SMA (smooth muscle antigen) Färbung .....	127
Protokoll für den IL-6 ELISA (Auszug R&d Systems).....	128
Danksagung .....	129

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Krankheitsbild der Sepsis: Überblick, „alte“ und „neue“ Definitionen

Von der Antike bis zum Mittelalter dachte man, dass Infektionskrankheiten gottgegeben seien und dass gewisse Miasmen für ihre Ausbreitung verantwortlich seien. Die Erfindung des Mikroskops durch Hans und Zacharias Jannsen, (seine Weiterentwicklung durch van Leeuwenhoek) und die Begründung der Mikrobiologie durch die Erforschung von Mikroorganismen stellten Meilensteine in der Entwicklung der Infektiologie dar. Der zusätzlich am Anfang des 19. Jahrhunderts aufflammende Darwinismus stellt einen weiteren Paradigmenwechsel dar, weil die Koexistenz von Bakterien und Erregern in Folge dessen als Wettkampf angesehen wird, bei dem sich die Spezies mit dem am besten auf die Umwelt abgestimmten Erbgut durchsetzt. Es kennzeichnet auch deswegen einen Bruch mit früheren Denkmustern, weil nun auch analysiert wird, wie unterschiedliche Organismen untereinander um die Hegemonialstellung in einem Milieu kämpfen. Im Laufe der Evolution haben sich Mikroorganismen daher immer mehr an ihre Wirte und ihre Konkurrenten adaptiert und sich so phylogenetisch immer weiter voneinander entfernt.

Von den aktuell knapp 10000 beschriebenen Bakterienspezies sind weniger als 5% humanpathogen<sup>113</sup>, das heißt, dass sie das Potenzial haben, Krankheiten im Menschen auszulösen. Gegebenenfalls sind diese Keime in der Lage aus einem primären Herd über das Blut zu streuen und so zu einer systemischen Bedrohung für den Organismus zu werden. Die Gesamtheit der komplexen Interaktionen zwischen den Keimen, ihren Bestandteilen und dem menschlichen Organismus, ist das, was im Volksmund unter einer Blutvergiftung oder Sepsis verstanden wird. Obwohl die Sepsis nicht die Fallzahlen der häufigsten Todesursachen in Industrienationen wie kardiovaskuläre oder onkologische Erkrankungen erreicht, handelt es sich um eine bereits in der Antike beschriebene Erkrankung, die heute noch sehr gefürchtet ist. Besonders in Drittweltländern entstehen durch die hohe Inzidenz von Infektionserkrankungen bei jungen Menschen soziale Tragödien und große volkswirtschaftliche Schäden.

Damit ein Keim weiterhin in der Lage ist eine solche Sepsis auszulösen, ist eine immerwährende Anpassung an seinen Wirt notwendig, was die relativ niedrige Anzahl an humanpathogenen Keimen innerhalb der Gattung der Bakterien erklärt. Während der menschliche Organismus versucht, ein immer effizienteres und dennoch breit gestelltes Immunsystem zu bilden, versuchen Bakterien gezielt die Verteidigungsmechanismen auszuhebeln. Ursache für diesen Selektionsprozess sind zufällige Mutationen in beiden Organismen. Um diesen Wettkampf in den richtigen Kontext setzen zu können und damit die Sepsis und ihre bekannten Mechanismen näher erklären zu können, sind folgende Definitionen notwendig.

### 1.1.1.Asepsis und Antisepsis

Asepsis beschreibt die völlige Abwesenheit von Keimen. Sie ist die Grundlage für Maßnahmen am Patienten. Zur Asepsis führende Maßnahmen beinhalten unter Anderem verschiedene Formen der(Dampf-)Sterilisation. Die Hände- oder Flächendesinfektion hingegen ist eine Maßnahme, die nicht zu einer vollständigen Beseitigung, sondern nur zu einer starken Reduktion der Keime (>99%) führt. Sie ist daher unter dem Begriff Antisepsis einzuordnen.

Des Weiteren beschreibt der Ausdruck aseptische Entzündung einen inflammatorischen Vorgang, an dem keine Keime beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die aseptischen Knochennekrosen.

### 1.1.2.Inflammation

Eine Inflammationsreaktion beruht auf einer lokalen oder systemischen Aktivierung des Immunsystems mit dem Ziel, einen Fremdkörper oder eine vom Körper als fremd angesehene Substanz zu eliminieren. Zu diesem Zweck bedient sich der Körper mehrerer Mechanismen. Die bekanntesten und seit knapp zwei Jahrtausenden von Celsus und Galen beschriebenen fünf „Kardinalsymptome“ der Entzündung: Tumor, Dolor, Rubor, Calor und functio laesa (Schwellung, Schmerz, Rötung, Überwärmung und Funktionseinschränkung) sind dabei das sichtbare Korrelat einer Entzündung. Einer Entzündung können mannigfaltige Ursachen zugrunde liegen. Neben Keimen und anderen Erregern können auch physikalische Phänomene wie Hitze, Kälte, stumpfe oder spitze Traumata, aber auch pharmakologische Substanzen und Gifte zu Entzündungsreaktionen führen. Zusätzlich sind unphysiologisch anfallende Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Gallen- oder Nierensteine ebenfalls eine mögliche Ursache für etwaige sogenannte aseptische Entzündungen.

All die oben genannten Ursachen führen entweder zu einem direkten Zelluntergang, einer direkten immunologischen Antwort oder über Gifte/Toxine zu anfallenden Stoffwechselprodukten, die in eine stereotypische Antwort des Organismus münden, welche Entzündung genannt wird. Dessen Intensität passt der Körper meist an die Schwere der Ursache an.

### 1.1.3.Antiinflammation, Apoptose und Nekrose

Neben der Möglichkeit eine Entzündungskaskade in Gang zu setzen, besitzt der Körper auch die Möglichkeit, sie zu unterdrücken. Diese Funktion ist unerlässlich für das tierische Leben, da ihr Wegfall zu Autoimmunreaktionen führen und u.a. die Symbiose mit Bakterien unmöglich machen würde. Die Wichtigkeit dieses Zusammenhangs ist auch im Rahmen von Abbaureaktionen enorm wichtig. Der Organismus besitzt die Fähigkeit seneszente oder entartete Zellen, zum Beispiel im Rahmen von Erbgutmutationen selektiv zu eliminieren.

Wichtig ist dabei, dass diese Zellen meist ihren eigenen Zelltod, die sogenannte Apoptose selbst einleiten. Das Immunsystem räumt diese Zellen anschließend weg, ohne eine Kaskade von Entzündungsmediatoren zu aktivieren. Der Erfolg dieses Mechanismus beruht auf der Kooperation zwischen

der zu eliminierenden Zelle und dem Immunsystem. Fehlregulationen dieses Systems (immortalisierte Zellen oder Immundefekte) sind nach der aktuellen wissenschaftlichen Meinung die Hauptursache für onkologische Prozesse.

Neben dem geregelten Zelltod kann der Körper sich auch einer Entzündungsreaktion bedienen, um dysfunktionelle Zellen zu vernichten. Dieser Mechanismus heißt Nekrose. Eine Nekrose ist meist bei Zelluntergängen externer Ursache involviert (Trauma, oder bakteriell induzierter Zelluntergang), spielt aber auch nach Herzinfarkten oder Apoplexen eine große Rolle. Charakteristisch für eine Nekrose ist die nicht begrenzte Immunreaktion, die zum Beispiel im Rahmen eines Herzinfarktes das primär betroffene Areal vergrößern kann.

Es fällt daher auch eine Reihe von Antigenen und potentiellen Zellgiften an, die auch ein sogenanntes SIRS hervorrufen können.

#### 1.1.4.SIRS

Das Akronym SIRS und steht für „Systemic Inflammatory Response Syndrome“. Die Consensus Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) mit der Society of Critical Care Medicine (SCCM) um Levy *et al.* <sup>2,3</sup> befanden in diesem Jahr, dass man bei einem Patienten (älter als 16 Jahre) ein SIRS diagnostizieren kann, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Eine nennenswerte Veränderung der Temperatur, das heißt eine Hypothermie ( $T < 36^{\circ}\text{C}$ ) oder eine Hyperthermie ( $T > 38,3^{\circ}\text{C}$ )
- Eine Veränderung der Herzfrequenz, das heißt eine Tachykardie mit über 90 Schlägen pro Minute bei Erwachsenen (Normwert 60-80/min) oder eine Erhöhung der Herzfrequenz um mindestens zwei Standardabweichungen, des altersspezifischen Mittelwertes.
- Eine Veränderung der Atmung: Dabei kann als Kriterium die Beeinträchtigung der äußeren Atmung, das heißt eine Hyperventilation mit einer Atemfrequenz über 20/Minute (Normwert 12-18) oder die kompensatorische Abatmung von Kohlenstoffdioxid zum Ausgleich einer Stoffwechselstörung mit niedrigen  $\text{PCO}_2$  von unter 32 mmHg (Normwert 35-40 mmHg) herangezogen werden
- Eine Veränderung der Leukozytenzahl als Zeichen einer Inflammationsreaktion: Es kann dabei sowohl zu einer Leukozytopenie von unter  $4 \times 10^9$  Leukozyten/L als Zeichen eines Verbrauchs oder zu einer Leukozytose, eine Erhöhung der Leukozytenzahl auf über  $12 \times 10^9$ /L als Zeichen einer vermehrten Produktion bei Inflammation kommen. Ebenfalls möglich ist eine Linksverschiebung mit mindestens 10% unreifer Granulozyten im Blut als Zeichen eines vermehrten Verbrauchs.

Wichtig bei hämatologischen Veränderungen im Rahmen eines SIRS ist, dass einige von ihnen Zeichen der Dysfunktion des Organismus sind (z.B. Hyperviskosität des Blutes durch Veränderung der Zusammensetzung, des Flussverhaltens und des Endothels) andere wie die Anämie, die Steigerung von Haptoglobin und von Ferritin auch als Zeichen der Anpassung an die Entzündungsreaktion angesehen werden können.<sup>4</sup>



Das SIRS ist ein eigenständiges Krankheitsbild, das nicht zwingend durch einen Keimbefall ausgelöst wird. Vielmehr ist es eine stereotypische Antwort des Körpers auf eine Schädigung (z.B. Traumata). Die Koinzidenz eines SIRS mit einer nachweisbaren Infektion definiert eine Sepsis.

### 1.1.5. Kontamination und Infektion

Bevor es zur Infektion kommt, muss ein Keimherd entstehen. Dieser kann von außen auf den Wirtsorganismus verschleppt werden (zum Beispiel Kontamination von Patienten), bereits Teil der physiologischen Flora des Organismus sein, wie es bei Darmbakterien oder der Hautflora der Fall ist, durch Verschleppung der Keime auf Fremdmaterial oder ein vorerkranktes Organ (Zustand nach Herzklappenimplantat) oder durch Reaktivierung einer (manchmal still verlaufenen) Erstinfektion gebildet werden. Hier wären zum Beispiel die Tuberkulose oder diverse Viren der Herpesfamilie zu nennen, die sich unter anderem bei Stress oder Immunsuppression reaktivieren. Die Proliferation dieser Keime an einer dafür nicht vorgesehenen Stelle, deren Persistenz und die Auslösung einer (Immun-) Reaktion des Wirtes auf diese Organismen wird Infektion genannt. Innerhalb der Gruppe der Mikroorganismen sind meist Viren, Bakterien oder Pilze die häufigsten biologischen Ursachen einer Entzündungsreaktion, da diese ubiquitär präsent sind. Aufgrund der niedrigen Sensitivität aktueller Screeningmaßnahmen wie Blutkulturen, (deren Sensitivität mit jeweils zwei aufwendig abgenommenen aeroben und zwei anaeroben Proben an verschiedenen Punktionsorten je nach Quelle nur bei maximal 80% liegt)<sup>5</sup>, ist eine klare Zuordnung des Erregers manchmal nicht möglich.

Man geht am ehesten davon aus, dass Bakterien die häufigsten Erreger sind. Unter anderem macht aber der weitaus schwerere Nachweis einer viralen Infektion die Erhebung harter Zahlen zum Keimspektrum schwierig.

<b>■ Tabelle 1-4. Sepsiskeimspektrum. Von Januar 1993 bis April 1994 (176.036 Krankenhauspatienten): 1.342 Sepsisepisoden bei 1.166 Patienten (Nach [40])</b>	
Keimspektrum	[%]
Grampositiv	39,5%
Gramnegativ	35,0%
Pilze	7,4%
Intraabdominelle Anaerobier	2,4%
Andere/nicht klassifizierte Keime	4,5%
Polymikrobielle Infektionen	11,1%
Summe	99,9%

**Abbildung 1: Keimspektrum in Blutkulturen 1993-1994 nach<sup>7</sup>**

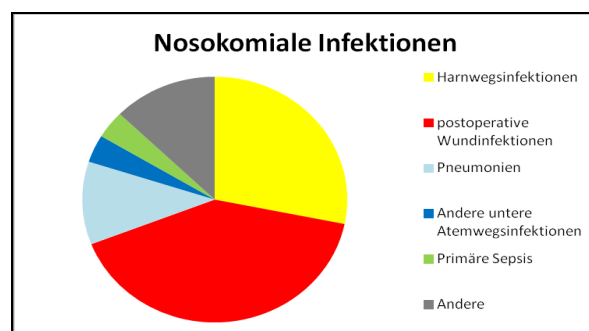
In Blutkulturen stellen Bakterien laut einer älteren Untersuchung aus dem Jahre 1994 (siehe Abbildung 7) mit bis zu 85% der Infektionen die häufigste Ursache einer positiven Probe da, während Pilze knapp 7% darstellen<sup>7</sup>. In Blutkulturen können allerdings keine Viren identifiziert werden.

Es wird allerdings davon ausgegangen, dass Pilze an bis zu 20% der Sepsisfälle beteiligt sind. Ferner können aber auch andere Parasiten (z.B. Plasmodien) zu schweren inflammatorischen Reaktionen führen.

Ambulante Infektionen treten in der Regel außerhalb des Krankenhauses auf. Ihnen ist daher gemein, dass es oft schwer ist sie zu quantifizieren, wenn der Patient zuhause bleibt und selbst bei Einweisung der primäre Fokus nicht immer gefunden werden kann. In diesem Sinne schätzten Gastmeier und Geffers<sup>6</sup> die besser dokumentierten nosokomialen Infektionen in Deutschland für das Jahr 2006 auf 400.000-600.000. Sie gliedert diese wie folgt:

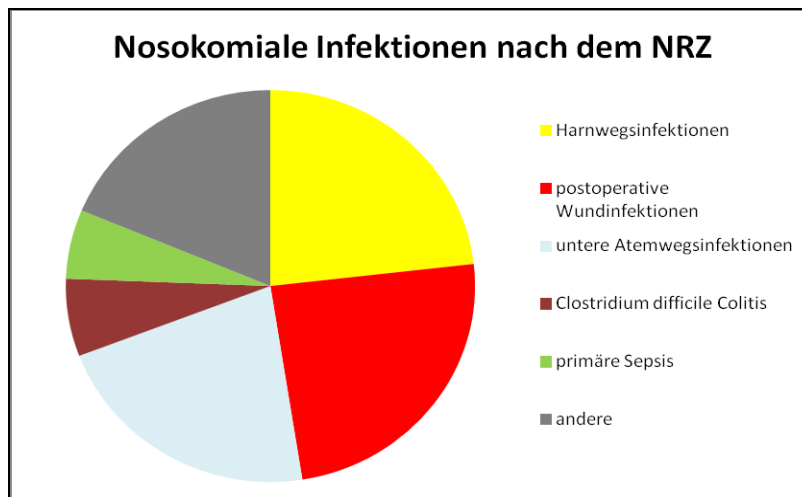
**Tabelle 1: Ursprungsorgane nosokomialer Infektionen, modifiziert nach Gastmeier und Geffers. <sup>6</sup>**

Nosokomiale Infektionen	Geschätzte Anzahl	Relative Häufigkeit (%)
Harnwegsinfektionen	155 000	28,18
postoperative Wundinfektionen	225 000	40,91
Pneumonien	60 000	10,91
Andere untere Atemwegsinfektionen	20 000	3,64
Primäre Sepsis	20 000	3,64
Andere vor allem Katheterinfektionen	70 000	12,72
Gesamt	550 000	100



**Abbildung 2: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen nach Gastmeier und Geffers. <sup>6</sup>**

Das nationale Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen Erkrankungen (NRZ) teilt die nosokomialen Erkrankungen 2011 wie folgt auf<sup>8</sup>:



**Abbildung 3: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen nach NRZ**

**Tabelle 2: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen**

Harnwegsinfektionen	23,2%
Postoperative Wundinfektionen	24,3%
untere Atemwegsinfektionen	21,7%
Clostridium difficile Colitis	6,4%
primäre Sepsis	5,7%
Andere	18,7%

Der Nachweis einer solchen Infektion beschreibt den Übergang eines SIRS in eine Sepsis.

### **1.1.6. Definition und weitere Stadien der Sepsis nach Sepsis-2 (Konferenz von 2002)**

Die Sepsis, ist eine in circa 30% der Fälle tödlich verlaufende Erkrankung, die durch eine Streuung von pathogenen Keimen (oder deren biologische Produkte) im Blut charakterisiert ist, welche eine systemische Reaktion mit überschießender Immunantwort und signifikanten Blutdruckabfall mit sich führt und im Multiorganversagen des Patienten enden kann (meist Versagen der Nierenfunktion, Gehirnfunktion oder Gerinnung). Jährlich werden in Deutschland mehr als 150 000 Fälle verzeichnet.

Die Sepsis wird in vier verschiedene Stadien eingeteilt, die ineinander übergehen und nicht immer klar abgrenzbar sind: SIRS → Sepsis → schwere Sepsis → septischer Schock

Die Sepsis selbst ist als durch einen in die Blutbahn geratenen Keim hervorgerufene systemische Inflammation definiert. Das Immunsystem löst daraufhin eine überschießende Immunreaktion aus, um die Infektion in Schach zu halten. Dies führt unter anderem zu einer vermehrten Teilung und Produktion von Blutzellen, einer erhöhten Einwanderung von Leukozyten in die Blutbahn und einer zuneh-

menden Permeabilität der Gefäße durch Schädigung des sensiblen Endothels in Blutgefäßen und Endorganen. Die von Leukozyten sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine (zum Beispiel Interleukine) verstärken die endotheltoxische Wirkung und damit die Undichtigkeit der Gefäße. Diese Permeabilitätserhöhung ist dabei ein zweiseitiges Schwert. Zum einem benötigen die Leukozyten Eintrittsstellen in die Blutbahn, andererseits führt eine länger anhaltende Permeabilitätserhöhung zu Ödemen, Schädigung des umliegenden Gewebes und letztlich zur relativen Hypovolämie. Der Körper kompensiert dies zunächst durch die sogenannte septische Hyperzirkulation, bei der stark erhöhte Herzschlagvolumina kurzfristig die periphere Oxygenierung gewährleisten. Sinkt in dieser Zeitspanne die Permeabilität nicht wieder auf den Ausgangswert zurück, verstärkt die weiterhin bestehende Extravasation die Ödeme und entzieht dem Intravasalraum im Sinne eines Circulus vitiosus Flüssigkeit. Anschließend erschöpft sich das Herz-Kreislaufsystem und kann bei einem niedrigen peripheren Widerstand und einer durch relativen Hypovolämie bedingten niedrigen Vorlast keine periphere Oxygenierung mehr gewährleisten. Persistiert dieser Zustand, so führt er meist über einen längeren Zeitraum zu einem nicht immer reversiblen Versagen von Organen. Ist dieser Sachverhalt erfüllt, spricht man von schwerer Sepsis. Im Rahmen der schweren Sepsis können multiple Organe versagen:

**Tabelle 3: Ursachen eines Multiorganversagens (MODS)**

Betroffenes Organsystem	Mögliche Ursachen
Hämatologie-Immunologie	Immunschwäche/Immunsuppression/Hyperaktivierung Anämie, Thrombozytopenie z.B. bei Verbrauchskoagulopathie, OPSI bei Splenektomie
Harnwege	Akutes Nierenversagen durch Hypoperfusion und Hypofiltration
Hepatobiliär	Leberversagen, Cholezystitis
Gastrointestinal	gastrointestinaler Barriereverlust „Durchwanderungsperitonitis“, Fehlbisiedelung, Stressulkus und Kolitis
Herzkreislauf	Akute Herzkreislaufinsuffizienz durch: Herzinsuffizienz, Permeabilität, vaskulärer Funktionsverlust, (bakterielle) Embolie
Lunge	ARDS, Lungenembolie
Gehirn	Schädigung durch Abbauprodukte

■ Tabelle 1-6. Diagnostische Kriterien des Multiorganversagens	
Akutes Lungenversagen	Hypoxämie ( $p_aO_2$ unter Altersnorm bei Atmung von Raumluft), pathologischer radiologischer Befund im Thoraxbild, Respiratortherapie erforderlich
Herzversagen, Kreislaufschock	Arterielle Hypotension trotz Volumensubstitution, Katecholamine erforderlich
Akutes Nierenversagen	Anstieg Serumkreatinin $> 3$ mg/dl, Kreatininclearance $< 15$ ml/min $\cdot 1,73$ m <sup>2</sup> trotz Normalisierung von Blutdruck und Flüssigkeitshaushalt, Nierenersatzverfahren erforderlich
Akutes Leberversagen	Anstieg Serumbilirubin $> 2$ mg/ml, Erhöhung Transaminasen $> 2$ faches der Norm
Gastrointestinale Stressblutung	Endoskopisch Erosionen oder Ulzera, Bluttransfusion erforderlich
Disseminierte intravasale Gerinnung	Abfall Thrombozytenzahl (Thrombopenie oder rascher Abfall um $150.000/\text{mm}^3$ ), Abfall der Fibrinogenkonzentration (Hypofibrinogenämie oder rascher Abfall um $150$ mg/dl), pathologische plasmatische Gerinnungstests, mindestens 2 (Quick-Wert, PTT, TT, Faktoren II, V, X)

Abbildung 4: Diagnostische Kriterien des Multiorganversagens nach Werdan, K.<sup>7</sup>

Neben der Kreislaufinsuffizienz mit Gefäßdysfunktion können im Rahmen einer Sepsis auch durch Bakterien produzierte Toxine, vermehrt anfallende reaktive Sauerstoffradikale, Abbauprodukte untergegangener Zellen oder die überschießende Immunantwort selbst- zumindest teilweise- ursächlich für das Multiorganversagen sein. Man spricht von sogenannten PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) und DAMPs (Damage associated molecular patterns).<sup>9</sup> PAMPs sind meist hochkonservierte Antigene, die vom angeborenen Immunsystem erkannt werden und die dem Organismus signalisieren, dass eine Infektion vorliegt. Beispielsweise sind Lipopolysaccharide (LPS), (siehe Kapitel 2.2) eine Oberflächenstruktur gram-negativer Bakterien ein PAMP, welches zur Immunreaktion der Sepsis beiträgt. Bei DAMPs handelt es sich in der Regel um Substanzen, die als Folge einer primären Schädigung (zum Beispiel nach einer bakteriellen Sepsis) anfallen. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen freien Hämoglobins, wie sie bei einer Hämolyse anfallen, das Outcome von Sepsispatienten negativ beeinflussen.<sup>10</sup> Des Weiteren kann neben vielen anderen Ursachen auch im Rahmen einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) mit Thrombusbildung ein Organinfarkt auftreten. Die Prävention des MODS erfordert daher eine Behandlung der kardialen, vaskulären sowie der hämatologischen Dysfunktion, die eine Sepsis hervorrufen kann.

Daher ist das Bild der schweren Sepsis ein interdisziplinär schwer zu beherrschendes Krankheitsbild, das eine Kooperation vieler Fachrichtungen benötigt um therapiert zu werden. Parallel zum Organversagen entwickelt sich meist trotz der multimodalen Maßnahmen eine Hypotonie. Bei längerem Bestehen spricht diese Hypotonie nicht mehr auf Katecholamine an. Werte unter 90 mmHg systolisch definieren daher das schwerste und letzte Stadium der Sepsis: den septischen Schock. Bei zunehmender Dauer und Stadium der Erkrankung erhöht sich die Mortalität stark. Sie verdoppelt sich von 30-40% im Schock auf bis zu 70-80%.<sup>7</sup>

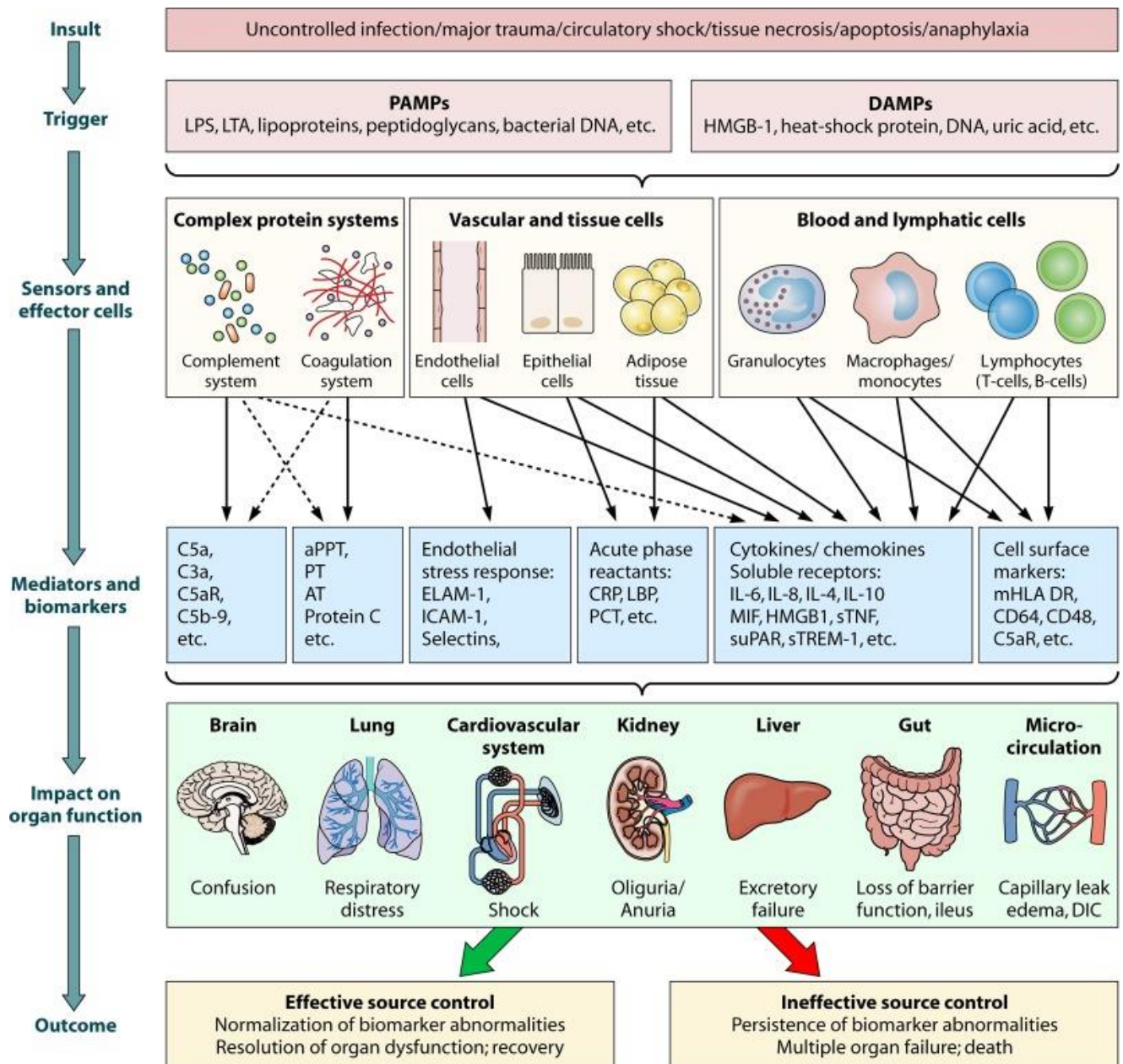


Abbildung 5: Entwicklung eines MODS durch PAMPs und DAMPs nach Reinhart<sup>9</sup>

### 1.1.7. Kritik an der Konsensuskonferenz 2002 und neue Richtlinien der Konsensuskonferenz 2016 (Sepsis-3)

Obwohl die Sepsis ein schon lange bekanntes Krankheitsbild ist, dessen mögliche Manifestationen sehr ausführlich beschrieben sind, hat sich die klinische Einteilung der Stadien SIRS und Sepsis wie sie in der Konsensuskonferenz 2002 beschrieben sind als schwer praktikabel erwiesen. In ihr spielen die fünf Faktoren Temperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Leukozytenzahl und den Keimnachweis die wichtigste Rolle. Diese Parameter haben alle eine durchaus hohe Sensitivität bei der Sepsis, sind allerdings zum einen nicht spezifisch genug und lassen völlig außer Acht, dass der Organschaden maßgeblich mit der Prognose einhergeht. Außerdem ist weder der Organschaden, der zur Definition der

schweren Sepsis gehört besonders spezifisch, noch unterscheidet diese Richtlinie zwischen verschiedenen Schweregraden der Organschädigung.

In diesem Sinne fand im Jahre 2016 die dritte Konsensuskonferenz (Sepsis-3)<sup>11</sup> statt, die das Ziel hatte, den Organschaden in den Fokus der Sepsisdiagnostik zu stellen. Die Experten dieser Konferenz empfehlen den sogenannten SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) Score, der sich aus Parametern zusammensetzt, die die Funktionseinschränkung verschiedener Organe quantifiziert.

Table 1. Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score<sup>a</sup>

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) <sup>b</sup>	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 <sup>b</sup>	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 <sup>b</sup>
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score <sup>c</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen.

<sup>a</sup> Adapted from Vincent et al.<sup>27</sup>

<sup>b</sup> Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

<sup>c</sup> Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

#### Abbildung 6: Der SOFA Score nach Singer *et al.*<sup>11</sup>

Dem Horowitz-Quotienten, der Gerinnung, dem Leberwert und Hämolyseparameter Bilirubin, dem Kreislaufstatus, dem GCS und dem Kreatininwert werden je nach Schwere der Erkrankung jeweils zwischen 0 und 4 Punkte vergeben. Die Summe ergibt den SOFA Score, der die Schwere der Erkrankung widerspiegelt<sup>11</sup>.

Als Sepsis bedingte Organdysfunktion wird nach Sepsis-3 eine durch Infektion ausgelöste Steigerung des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte definiert. Mehr als 10% der Patienten mit einer Sepsis bedingten Organdysfunktion sterben noch im Krankenhaus. Die Stadien „SIRS“ und „Schwere Sepsis“ aus der Konferenz 2002 fallen weg. Kriterien für den septischen Schock sind dabei ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von unter 65 mmHg unter Vasopressoreinsatz oder erhöhte Laktatspiegel (>2mmol·L<sup>-1</sup>). Eine derartige Konstellation steigert die Sterbewahrscheinlichkeit laut den Autoren um bis zu 40%.

Die Einführung des sogenannten quick SOFA (qSOFA) soll zusätzlich beim einem Verdacht auf Sepsis (ähnlich wie der C(U)RB-65 bei Pneumonie) die Gefährdung des Patienten quantifizieren. Er setzt sich aus folgenden Parametern zusammen:

1. Atemfrequenz ≥22/min
2. Bewusstseinsseinschränkung
3. systolischer Blutdruck ≤100 mmHg



Die Einteilung nach dem SOFA Score ist aus mehreren Gründen problematisch. Zum einen ist der Score außerhalb von intensivmedizinischen Gesellschaften nicht sehr bekannt. Zudem wurde der Cut-off für die verschiedenen Werte der Organdysfunktion durch eine Expertendiskussion (Konsensus) festgelegt und wird sicherlich im Rahmen der demnächst auftretenden Evidenzen wahrscheinlich verändert werden. Letztendlich ist der Blutdruck sowohl im SOFA Score als auch in der Definition des septischen Schocks zu finden, was zu Missverständnissen führen könnte.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde die Sepsis-2 Definition als Basis verwendet, zum einen um eine Konkordanz mit vorherigen Experimenten sicherzustellen aber auch, weil dem Erscheinen der Sepsis-3 Richtlinien schon einige Versuche vorangegangen waren. Etwaige Veränderungen der Ergebnisse oder der Durchführung der Versuche, die bei einem Versuchsmodell, das auf die neuen Sepsis-3-Leitlinien fußt, möglicherweise hätten auftreten können, werden in der Diskussion (siehe Kapitel 4) ausführlicher besprochen.

## **1.2. Mensch und Sepsis: Chronik der Krankheit, Erklärungsmuster und Prävention**

### **1.2.1.Chronologie der Sepsis**

Die Erstdokumentation einer Sepsis wird dem griechischen Arzt Hippokrates zugeschrieben, der zwar einen solchen Begriff nicht verwendete aber bereits damals schon die Gefahren einer Zentralisierung des Kreislaufs im Rahmen des septischen Schocks beschrieb.<sup>9, 12</sup> Zu Beginn der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts postulierten die italienischen Ärzte Machiavelli und Fracastoro jeweils ihre Theorien. Machiavelli meinte, die Sepsis sei zu Beginn leicht zu behandeln und schwer zu diagnostizieren, aber dass sich diese Tatsache mit der Zeit umkehre. Er kann damit als Begründer der sogenannten „early onset“ Therapie angesehen werden, die eine Verbesserung der Prognose durch früheres Eingreifen bei Verdacht auf Sepsis bewirken konnte.<sup>9,13</sup> Fracastoro erstellte die Hypothese, dass Infektion durch mikroskopische und aerogen übertragbare Keime und Sporen entstehe und wurde durch van Leeuwenhoek bestätigt, als dieser mit dem Mikroskop beobachtete Mundraumbakterien zeichnete.<sup>9,14</sup> Des Weiteren waren zahlreiche Pioniere wie Max von Pettenkofer, Robert Koch und Louis Pasteur durch ihre Forschung am Aufbau der infektiologischen Lehre, wie wir sie heute kennen beteiligt, sodass Schrottmüller (1914) die erste allgemeine Definition der Sepsis formulierte: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“. William Osler fügte zu dem noch hinzu, dass die Immunreaktion des Organismus maßgeblich an dem protrahierten Verlauf einer Sepsis beteiligt sei und stellte damit weitere Weichen für die aktuelle Forschung. Weitere wichtige Pioniere in der Geschichte der Sepsis sind der Brite Edward Jenner und der ungarische Arzt Ignaz Philipp Semmelweis. Ihnen ist es maßgeblich zu verdanken, dass die Sepsisinzidenz durch präventive Maßnahmen stark zurückgegangen ist. Jenner gilt dabei als Erstbeschreiber der modernen Impfung. Semmelweis verdankt die medizinische Gesellschaft die hygienische Händedesinfektion.



## 1.2.2. Sepsis und Prävention

Die Prävention von Infektionserkrankungen beinhaltet vor allem die Patientenaufklärung, die Impfung und die hygienische Händedesinfektion vor dem Patientenkontakt. Wie wichtig letztere ist, zeigt die Geschichte von Semmelweis, ungarischer Arzt des 19. Jahrhunderts, der als Urheber der hygienischen Händedesinfektion mit Chlorlösungen gilt. Er erkannte den Zusammenhang zwischen der stark steigenden Mortalität auf gynäkologischen Stationen und dem 1823 datierten Beginn der Sektion humanmedizinischer Studenten an Leichen vor der Patientenvsiste.

In unserer Metaanalyse eines Artikels von Herbert F. Spier<sup>15</sup> war die durchschnittliche Muttersterblichkeit über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren in der 1. geburtshilflichen Klinik in Wien initial 1,89%. Bei Beginn der Leichensektion 1823-1832 stieg diese auf 4,93% an und sank trotz der weiter durchgeführten Sektion und des Widerstandes der Belegschaft mit Beginn der Desinfektion auf durchschnittlich 2,13% in den Jahren 1847 und 1848. Diese Gründe für die Mortalität waren zum großen Teil Sepsis im Wochenbett, bei Keimverschleppung durch die Belegschaft, zum großen Teil durch Ärzte, da Semmelweis auch zeigen konnte, dass die Mortalität niedriger blieb, als man Frauen nur vom Pflegepersonal behandeln ließ.

Des Weiteren beschreiben weitere Autoren eine Reduktion der Inzidenz eines peripartalen Fiebers von 18% auf 3% durch die Einführung der Händedesinfektion.<sup>9</sup> Dies entspricht einer relativen Risikoreduktion von 83,3%.

Auch wenn Semmelweis die Anerkennung für seine medizinische Leistung verwehrt blieb, ist von der Händedesinfektion in der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Ihre Rolle in der Prävention der Kontamination des Klinikpersonals und damit in der Vorbeugung von vermeidbaren Infektionen ist heutzutage unumstritten.<sup>15</sup>

### 1.2.2.1. Beispiel aller Präventionsmaßnahmen anhand einer besonderen Sepsisform, dem OPSI

Eine besonders schwere Form der Sepsis stellt aufgrund ihrer hohen Letalität das sogenannte OPSI dar. OPSI steht dabei für Overwhelming Post Splenektomy Infection syndrome (Überschießendes Postspelektomieinfektionssyndrom). Diese Erkrankung betrifft Patienten, denen die Milz operativ entfernt wurde (Splenektomie). Aufgrund der heruntergesetzten humoralen Antwort ist der Organismus nicht mehr in der Lage bekapselte meist gramnegative Bakterien zu opsonieren und damit zu eliminieren. Dies führt zu einer erhöhten Inzidenz an Pneumonien und Meningitiden. In einer klinischen Studie von Jockovich konnte das OPSI-Risiko von 6,8% nach Splenektomie durch konsequentes Impfen und Aufklären auf 0% gesenkt werden.<sup>16</sup> Dies ist ein Beispiel dafür, dass die Prävention eine wichtige Rolle bei der Sepsis spielt und durch adäquate Maßnahmen wie Impfung und Aufklärung sowohl Inzidenz wie auch die Letalität des OPSI gesenkt werden kann.<sup>17</sup>

Des Weiteren können OPSI Patienten im Rahmen einer Meningitis (z.B. durch *Neisseria meningitidis*), an einem sogenannten Waterhouse Friedrichsen Syndrom erkranken. Bei dieser Maximalausprägung der Sepsis führt eine vorausgehende Verbrauchskoagulopathie zu einem Infarkt der Nebennieren und zu einem absoluten Mangel an Glucocorticoiden und Vasopressoren. An der infausten Prognose lässt sich ableiten, welche zentrale Rolle sowohl die Milz als auch diese Hormone bei der Sepsis spielen. In diesem Sinne lassen sich im Rahmen der Therapie mehrere Säulen definieren, die bei der intensivmedizinischen Betreuung septischer Patienten wichtig sind.<sup>18</sup>

### 1.2.3. Herausforderungen in der Prävention der Sepsis

Die Sepsis stellt in Tagen der Globalisierung eine große Herausforderung dar. Die größere Reisefreiheit zum Beispiel im Rahmen des Medizintourismus führt zwangsläufig zu einem Austausch von Keimen zwischen Individuen und einem Austausch von Resistenzen innerhalb von Bakterien. Dadurch wird beispielsweise eine gezielte antibiotische Therapie komplizierter. In diesem Sinne kann man die durch die Sepsis verursachten Probleme in deterministische, wie der durch die Krankheit oder den Tod ausgelöste wirtschaftliche Schäden, oder in stochastische Probleme (wie mögliche Mutationen) einteilen.

#### 1.2.3.1. Deterministische Probleme

Mit ungefähr 160 000 Fällen und einer Letalität von 36,3%<sup>19</sup> in Deutschland verursacht die Sepsis allein hierzulande einen enormen wirtschaftlichen Schaden. Es ist schwer genaue Zahlen zu eruieren, da der Begriff „Blutvergiftung“ meistens nicht in Dokumenten vorgefunden wird. Es wird bevorzugt das primär befallene Organ (z.B. Lungenentzündung) als Diagnose kodiert. Dennoch schätzt das Bundesministerium für Bildung und Forschung, dass auf Intensivstationen, die meist die Sepsis und ihre Folgeschäden behandeln, bis zu 1,7 Milliarden Euro in die direkte Behandlung dieser Erkrankung und weitere 6,3 Milliarden an Schäden durch Krankheitsdauer, Tod und frühzeitige Berentung entstehen. Die Sepsisbehandlung entspricht etwa 32% der Kosten, die auf einer Intensivstation anfallen, obwohl Stichproben auf Intensivstationen suggerieren, dass die Punktprävalenz der Sepsis auf diesen Stationen bei ungefähr 11% liegen.<sup>20</sup>

Auch in den USA kostet die Sepsis pro Erkrankungsfall ungefähr 22 100 US-Dollar und belastet das dortige Gesundheitswesen insgesamt mit einer Summe von über 16 Milliarden Dollar pro Jahr.<sup>21</sup>

Mit dem Ausbau der Maximalversorgung ist die Inzidenz dieser Erkrankung seit über 30 Jahren angestiegen.<sup>22</sup> In den letzten 20 Jahren vor der Jahrhundertwende stieg die Inzidenz durchschnittlich um mehr als 8% jährlich. Allein zwischen 2001 und 2008 gab es eine Inzidenzzunahme von 70% in den USA. Nach Angaben des deutschen Ärzteblattes<sup>104</sup> stieg die Fallzahl zwischen 2007 und 2013 im Schnitt um 5,7% pro Jahr an und erreichte fast 280 000 Fälle jährlich. Dies entspricht 335 Sepsisfällen pro 100 000 Einwohner. Außerdem stieg der Anteil der Patienten, die in diesem Zeitraum an schwerer Sepsis erkrankten um 14 Prozentpunkte auf 41%. Gleichzeitig sank aber die Letalität um 2,7 Prozentpunkte mit 24,3% auf unter ein Viertel.<sup>104</sup> Des Weiteren wird eine Inzidenzsteigerung um 1,5% pro Jahr erwartet. Eine Ursache dafür ist die immer bessere Versorgung von schwerkranken Patienten, die besonders Gefahr laufen sich zu infizieren. Sie stellen damit ein kostenintensives Patientenkollektiv dar. Oft führen die Langzeitschäden, die Patienten nach einer Sepsis aufweisen können oder ihre Komorbiditäten zu einem Circulus vitiosus. Beispielsweise kann eine rezidivierende Tuberkulose andere Infektionen fördern oder durch andere Infektionen begünstigt werden. Vor allem gehören Menschen im nicht arbeitsfähigen Alter (wie z.B. Kinder und Senioren) oder chronisch erkrankte Patienten (z.B. Mukoviszidosepatienten) zu den Hochrisikopatienten.<sup>21</sup>

Die Sepsis ist daher eine Erkrankung aller Altersgruppen und eine mögliche Komplikation aller medizinischen Fachrichtungen. Meist erfordert sie eine Behandlung auf Intensivstation mit all den damit verbundenen Kosten. Sie ist auch eine Erkrankung mit großer Unsicherheit sowohl für die Angehörigen hinsichtlich eines möglichen Todesfalls als auch für das Personal, dass eine eigene Ansteckung (bei manchmal unbekanntem Keim) wie auch eine Keimverschleppung verhindern muss.

### 1.2.3.2. Stochastische Probleme

Stochastische Ereignisse sind seltener als deterministische. Deren Auftreten ist aber schwerwiegender. Sie bezeichnen das Auftreten von Mutationen oder die Weitergabe von Mutationen, die einen bestimmten Keim z.B. gegen Antibiotika resistent macht. Aufgrund der Massenverwendung von Antibiotika in der Mastindustrie hierzulande und in der Patientenversorgung außerhalb von Deutschland ist die Behandlung multiresistenter Keime wie MRSA oder 4-MRGN auf Intensivstationen heutzutage an der Tagesordnung. Auch Keime mit der im Jahre 2008 entdeckten sogenannten New-Delhi Metallo  $\beta$ -Lactamase sind mittlerweile in deutschen Krankenhauskeimen vertreten. Sie bilden Resistenzen gegen Carbapeneme aus, die als Reserveantibiotika gelten.<sup>24</sup> Dies erschwert die antibiotische Abdeckung im Rahmen einer Immunschwäche ungemein. Viele Autoren kündigen daher schon eine sogenannte „postantibiotische Era“ an.<sup>25</sup> Die Entwicklung neuer Therapiesäulen wird daher in näherer Zukunft einen großen Stellenwert haben.

## 1.3. Therapie

Im therapeutischen Fokus liegt die (meist) chirurgische Entfernung des krankheitsauslösenden biologischen Materials nach der Maxime des Hippokrates „ubi pus ibi evacua“ (Wo Eiter ist, entleere ihn) und die Gabe von Immunsystem unterstützenden Antiinfektiva (Antibiotika, Antimykotika, Virostatika, Antihelmitika usw.). In diesem Rahmen durchgeführte Antibiotikatherapien erfolgen „gezielt“, d.h. mit Kenntnis des Antibiogrammes oder „kalkuliert“ nach der Infektionsquelle. Hierbei sind die Entscheidungskriterien der Infektionsfokus (z.B. Pneumonie oder Zystitis) und ob der Keim ambulant oder nosokomial erworben wurde.

Eine supportive und antihypotensive Behandlung erfolgt durch interindividuell unterschiedliche Mengen von zuerst kristalloiden Lösungen, kolloide Lösungen und schließlich Blutprodukten. Zeitgleich zur Volumensubstitution depletierter Patienten sollen Vasopressoren wie vor allem Noradrenalin, Vasopressin, Dobutamin und Adrenalin den peripheren Gefäßtonus positiv beeinflussen.

Parallel dazu muss im Rahmen der supportiven Therapie neben der Gewährleistung einer ausreichenden Oxygenierung des Patienten durch eine an die Grundkrankheit angepasste Beatmung (z.B. lungenprotektiv bei manifester Pneumonie) auf den vermehrten kalorischen Bedarf und möglichen Blutzuckerentgleisungen geachtet werden.

Zusätzlich werden im Rahmen der speziellen Therapie individuell auftretende Komplikationen wie Nierenversagen oder Blutungskomplikationen behandelt. Trotz all dieser Maßnahmen bleibt die Sepsis eine schwer zu beherrschende Erkrankung mit hoher Letalität.

Emanuel Rivers konnte in seiner Studie belegen, dass ein früher Beginn der Therapie mit aggressiver Flüssigkeitssubstitution mehr Blutprodukttransfusion und Inotropika und einer Aufnahme auf die Intensivstation innerhalb von 6 Stunden im Rahmen der sogenannten „Early goal directed therapy“ (EGDT) die Prognose positiv beeinflussen kann.<sup>26</sup> Versuche, diese Ergebnisse zu reproduzieren scheiterten allerdings im Rahmen der ARISE und ANZICS-Studien.<sup>27,28</sup> Unter anderem deshalb gerät dieses Therapiekonzept mehr und mehr in die Kritik. Allen voran wird an der Rechtmäßigkeit der aggressiven Volumentherapie gezweifelt. Kristalloide Lösungen haben mit 5-20% einen sehr niedrigen Volu-

meneffekt und führen zu Ödemen.<sup>30</sup> Paul Marik<sup>30</sup> fasste in seinem Review zusammen, dass bei einem nicht kardiochirurgischen Patientenkollektiv eine aggressive Flüssigkeitssubstitution zur Entwicklung eines Lungenödems (erhöhtes sogenanntes ECLW, oder Extracorporeal lung water) mit ARDS, zur Entwicklung einer Malabsorption durch gastrointestinale Ödeme zur diastolischen Insuffizienz durch Volumenüberladung und zur hepatischen Funktionsstörung durch einen Anstieg des intraabdominellen Drucks führt. Dies führe zu einer höheren Gesamtmortalität.<sup>29,30</sup>

Des Weiteren kritisiert Marik die Maxime sich am zentralen Venendruck (ZVD) des Patienten zu orientieren, um die notwendige Flüssigkeitsgabe zu quantifizieren. Hohe ZVD-Werte (>8 mmHg) würden zur Entwicklung einer akuten Nierenschädigung (AKI) beitragen.<sup>31</sup>

Er empfiehlt die Benutzung des MCFP (Mean circulatory filling pressure). Dieser Druck entspricht dem systemischen Druck, der bei einem Herzstillstand im ganzen Körper messbar wäre und beschreibt sehr sensitiv die Volumenbelastung des Körpers und die Spannung der glatten Muskulatur.<sup>30,32,33,34</sup>

Bei den kolloidalen Lösungen ist die Datenlage zur Sicherheit der Gelatine nicht sehr ausgeprägt und es konnten durch Metaanalysen beim Einsatz von Hydroxyethylstärke (HAES 6%) vermehrt Fälle von Niereninsuffizienz bei der Sepsis festgestellt werden.<sup>35</sup> Im Rahmen der sogenannten SAFE-Studie (Saline versus Albumin Fluid Evaluation) wurde anhand von 6997 Patienten der Mehrwert einer 4% Albuminlösung analysiert. Es konnte kein Therapievorteil festgestellt werden.<sup>36</sup> Albumine haben zudem genauso wie Blutprodukte immer ein niedriges Infektionsrisiko. Es fehlt folglich eine Substanz, die die hämodynamische Dysregulation wieder beheben kann.

Es ist daher Aufgabe der experimentellen Medizin die genauen Mechanismen zu erforschen, die die hohe Letalität der Sepsis bedingen. In diesem Sinne rückt neben der kausalen Therapie (Fokussanierung), der supportiven Flüssigkeitstherapie und der individuellen Therapie (Steroide, Nierenersatzverfahren) eine vierte Säule immer mehr in den Vordergrund: eine antiphlogistische, „gefäßadjunktive“ Therapie. Diese Therapie beruht darauf, dass Gefäße nicht wie das lockere Bindegewebe als Entzündungsort geeignet sind, was die systemische Schwere einer Sepsis erklärt. Eine unterstützende Therapie für die betroffenen Schichten des Gefäßes ist daher im Fokus der Sepsisforschung. Pathophysiologisch werden vermehrt auch andere Ansätze wie die übermäßige Vasoplegie der Gefäße durch den Botenstoff NO<sup>37</sup> und die Zerstörung der Endothelzellen und ihrer Oberflächenmoleküle<sup>38</sup> für die Schwere der Erkrankung verantwortlich gemacht und weiter erforscht. Unter diesen Gesichtspunkten wurden seit der Jahrtausendwende mehrere Meilensteine erreicht.

## **1.4. Immunkompetenz und Sepsis: Studienlage**

Das Immunsystem hat in der Pathophysiologie der Sepsis einen hohen Stellenwert. Hierbei spielen eine Menge Proteine und Hilfssubstanzen eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sind für diese Arbeit bestimmte Interleukine, Chemokine sowie Cadherine wichtig.

Das CCL2 (Chemokine Ligand 2), das auch MCP1 (monocyte chemoattractant protein1) genannt wird, ist eine pro-inflammatorische Substanz, die am Ort der Entzündung synthetisiert wird und an Proteo-

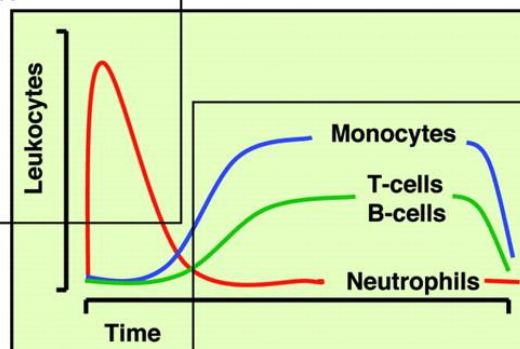
glykanen der Endothelzellen bindet um Monozyten und T-Lymphozyten anzulocken<sup>123</sup>. Die Genexpression wird unter anderem durch PDGF induziert.

Interleukine sind von Immunzellen sezernierte Substanzen, die als Zell-Zell-Kommunikatoren fungieren. Sie können wie im Falle des IL-10 anti-inflammatorisch<sup>74</sup> oder wie das IL-1 pro-inflammatorisch wirksam sein. Arbeiten von Kabay et al aus dem Jahre 2007 belegen, dass die Überexpression von IL-10 im Balb/c Mausmodell über die Reduktion der Inflammation den Krankheitsverlauf des MODS attenuieren kann.<sup>74</sup>

Das IL-6 oder Interleukin-6 nimmt eine Sonderstellung in dieser Gruppe von Mediatoren ein, denn es handelt sich um eine sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirkende Substanz. Sie wird sowohl von Makrophagen als auch von Lymphozyten produziert. Wichtige Funktionen sind die Temperatursollwertverstellung im Hypothalamus, sodass eine Erhöhung des Stoffwechsels und die Induktion der Produktion von Akute Phase Proteinen wie das CRP in der Leber stattfinden. Des Weiteren unterdrückt IL-6 die pro-inflammatorischen Wirkungen des TNF- $\alpha$  und IL-1<sup>127</sup> und begünstigt die Proliferation von Monozyten und Lymphozyten zum Nachteil der neutrophilen Granulozyten.<sup>126,127</sup> Hohe IL6-Spiegel fördern daher eine Transition in ein chronisch entzündliches Geschehen.

#### Resolution of Innate Immunity

Blocks pro-inflammatory cytokine expression  
Suppresses CXCL1 and CXCL8 release  
Promotes CXCL5 and CXCL6 release  
Induces IL-1 and TNF $\alpha$  antagonists  
Infiltrating neutrophils shed IL-6R  
Promotes neutrophil apoptosis



#### Development of Acquired Immunity

Affects disease resolution  
Influences T-cell polarization  
Rescues T-cells from apoptosis  
Governs Regulatory T-cell responses  
Promotes chemokine-directed migration  
Affects CD62L-mediated T-cell adhesion  
Defines pattern of monocyte differentiation  
Directs dendritic cell maturation and activity  
Affects T-cell chemokine receptor expression

Abbildung 7: Transition vom angeborenen in das erworbene Immunsystem nach Jones SA.,<sup>125</sup>

Neuere Arbeiten zur Pathophysiologie der Sepsis konnten belegen, dass in der Sepsis Phasen der Immunsuppression auftreten können, die sich mit Phasen der überschießenden Immunantwort abwechseln. In den Milzen der Patienten konnte eine Depletion von immunkompetenten Leukozyten gefunden werden.<sup>39,40,41</sup>

Außerdem spielen wohl zusätzliche Mechanismen bei den Phasen der Immunsuppression eine Rolle. Der sogenannte „Glucocorticoid induced leucine zipper“ (GILZ) scheint bei längeren Bestehen einer Endotoxinämie zu einer Toleranz der Makrophagen gegen diese bakteriellen Gifte zu führen. Die Stärke ihrer Aktivierung nimmt mit der Zeit ab.<sup>42</sup>

### 1.4.1. Glucocorticoide

Trotz des Erfolges isolierter Studien zur Indikation von niedrig dosierten Glucocorticoiden bei der Sepsis,<sup>43</sup> haben größere Studien keinen signifikanten Überlebensvorteil einer generalisierten sogenannten „low dose corticosteroid“ Therapie bei septischen Patienten zeigen können.<sup>44</sup> Dennoch bleiben für einzelne Indikationen wie die Meningitis Kortikosteroide in den Therapieempfehlungen.

### 1.4.2. 5-HT<sub>7</sub> Antagonismus

Die Entdeckung von Serotoninrezeptoren (insbesondere 5-HT<sub>7</sub>) auf immunologisch aktiven Geweben führte im Rahmen eines Tierversuchs an Ratten mit 5-HT<sub>7</sub>-Agonisten zu einer Abschwächung der überschießenden Immunreaktion und einer verbesserten Prognose.<sup>45</sup>

## 1.5. Sepsis und kardiovaskuläre Dysfunktion

Die Pathophysiologie der septischen Gefäßdysfunktion folgt den Kardinalzeichen der Entzündung. Die Senkung des Muskeltonus durch Stickstoffmonoxid (NO) mit Gefäßdilatation, die Rarefizierung der verschiedenen Gefäßzellen und die pathologisch erhöhte Permeabilität führen zu einer Funktionseinschränkung des Gefäßes mit Ödemen und folglich zu einer relativen Hypovolämie, die schlecht auf Flüssigkeitssubstitution anspricht.

Eine Erklärung hierfür ist die Rarefizierung der Perizyten und Endothelzellen als direkte Folge der Entzündung. Die Perizyten können ihre gefäßregulierende Funktion nicht mehr erfüllen, der Gefäßtonus passt sich nicht mehr an und kann der Dysregulierung des Gefäßsystems mit erhöhter Permeabilität und zunehmender kardialer Erschöpfung nicht mehr entgegenwirken.

Eine ergänzende Erklärung ist die Funktion einer bisher unterschätzten und wenig erforschten Struktur: der endothelialen Glycocalyx. Es handelt sich hierbei um eine bis zu 500 nm dicke Schicht aus Syndecan-1 und Heparansulfat, die durch ihre Ladung an der Rheologie des Kreislaufes beteiligt ist. Das bei aggressiver Volumentherapie anfallende atriale natriuretische Peptid (ANP) und die Entzündungsreaktion bei der Sepsis führen zu einer Schädigung der Glycocalyx und der sie tragenden Endothelzellen.<sup>46</sup>

### 1.5.1. L-Name

Als potenter Inhibitor der NO Synthese durch Hemmung der NO-Synthase<sup>47</sup> führt L-Name (NG-nitro-L-arginine methyl ester) über seine Wirkung an den Gefäßen zu einer Steigerung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und des systemischen Gefäßwiderstandes, ohne die Spiegel der inflammatorischen Botenstoffe zu beeinflussen.<sup>48</sup>

### 1.5.2. Esmolol

Der kurzwirksame  $\beta$ -Blocker Esmolol zeigte in Tierversuchen eine protektive Wirkung in der Sepsis. Die Autoren beschreiben eine minimale Senkung der Herzfrequenz und eine Erhöhung des Schlagvolumens nach der Esmololwirkung, die zu einem verbesserten Überleben führt. Die sublingual untersuchte Mikrozirkulation bleibt allerdings laut den Autoren gleich.<sup>49,50</sup>

Ein Erklärungsansatz für die Wirkung des Esmolols ist die kardioprotektive Wirkung des Beta-Blockers, der als kurzwirksamer Überladungsschutz für das Herz fungiert. Es findet möglicherweise eine Resensibilisierung der Rezeptoren statt. Zusätzlich würde der dadurch dominierende  $\alpha$ -Tonus zu einer Vasokonstriktion in den Gefäßen führen und dem „vascular leakage“ entgegenwirken. Zudem wirkt er einer überhöhten Lipolyse und Hyperglykämie (Zielwert <150 mg/dL) entgegen.

## 1.6. Diagnostische Laborparameter in der Sepsis: Studienlage

Eine Kohortenstudie der Universität Jena untersuchte die jeweilige Sensitivität und Spezifität verschiedener Biomarker wie C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin (PCT), Interleukin-6 (IL-6) oder Interleukin-8 (IL-8) bei der Sepsis. Obwohl PCT dabei am Besten abschnitt, folgerten die Autoren, dass selbst das PCT nicht den klinischen Anforderungen genügt, um einen Biomarker darzustellen, der alleine verlässlich genug wäre. Er eignet sich jedoch gut zur Verlaufskontrolle einer bakteriellen Sepsis.<sup>9</sup>

Bei septischen Neugeborenen, bei denen vor allem Gruppe-B Streptokokken und *Escherichia coli* hohe Prävalenzen aufweisen, wird ebenfalls nach Möglichkeiten gesucht pro-inflammatorische Mediatoren wie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor Necrosis Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) oder CD64 als Screeningverfahren zu verwenden.<sup>51</sup>

Ein weiterer vielversprechender Test ist die Messung von Syndecan-1, dem Oberflächenmolekül der Glycocalyx. Nelson *et al.* konnte zeigen, dass die Höhe der Spiegel mit dem SOFA-Score korreliert.<sup>52</sup>

Bisher existiert aber kein spezifischer Test für die Sepsis.<sup>124</sup> Es bleibt daher eine Aufgabe der Forschung, Wege zu finden, den schwer beherrschbaren Blutdruckabfall, der durch erhöhte Gefäßpermeabilität aufgrund einer systemisch überschießenden Immunreaktion zu erklären ist, medikamentös kontrollieren zu können.

In diesem Sinne ist es das Ziel dieser Arbeit weitere Signalwege zu finden, die die septische Kaskade positiv beeinflussen können.

## 1.7. Die Rolle der mikrovaskulären Stabilität

### 1.7.1. Angiopoietin 2 (Ang 2)

Im Vorfeld konnten wir zeigen, dass durch die Überexpression des Liganden Angiopoietin 2 (Ang-2) eine Sepsis-ähnliche hypotone Hyperzirkulation bei den Mäusen ausgelöst wird. Diese geht mit einem Verlust der Perizyten, einer erhöhten Permeabilität, einer Hypotension und einem reaktiv gesteigertem Herzzeitvolumen einher. Durch die Überexpression von Angiopoietin 1, des Gegenspielers des Ang-2 am Tie-2 Rezeptor, kann die Wirkung des Ang-2 wieder rückgängig gemacht werden. Des Weiteren kann auch die Überexpression von PDGF- $\beta$ , den Sepsis-ähnlichen Zustand wieder umkehren. PDGF- $\beta$  ist eine chemotaktisch wirksame Substanz, die in der Lage ist, Perizyten in das dysfunktionale Gefäß zu führen. Im weiteren Verlauf konnte auch gezeigt werden, dass ein Antikörper, der spezifisch gegen das Ang-2 wirkt, in der Lage war, die Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Sepsis zu steigern.<sup>53</sup>

### 1.7.2. Das Thymosin Beta 4 System (T $\beta$ 4)

Ein weiterer Kandidat der mikrovaskulären Stabilisierung ist Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4), das häufigste im menschlichen Körper vorkommende Thymosin. Thymosine sind eine Reihe ubiquitär vorkommender Proteine, die unter anderem bei der Proliferation lymphatischer Gewebe, Wundheilungsprozessen, Autoimmunkrankheiten der Angiogenese und der Aktinpolymerisation eine Rolle spielen.

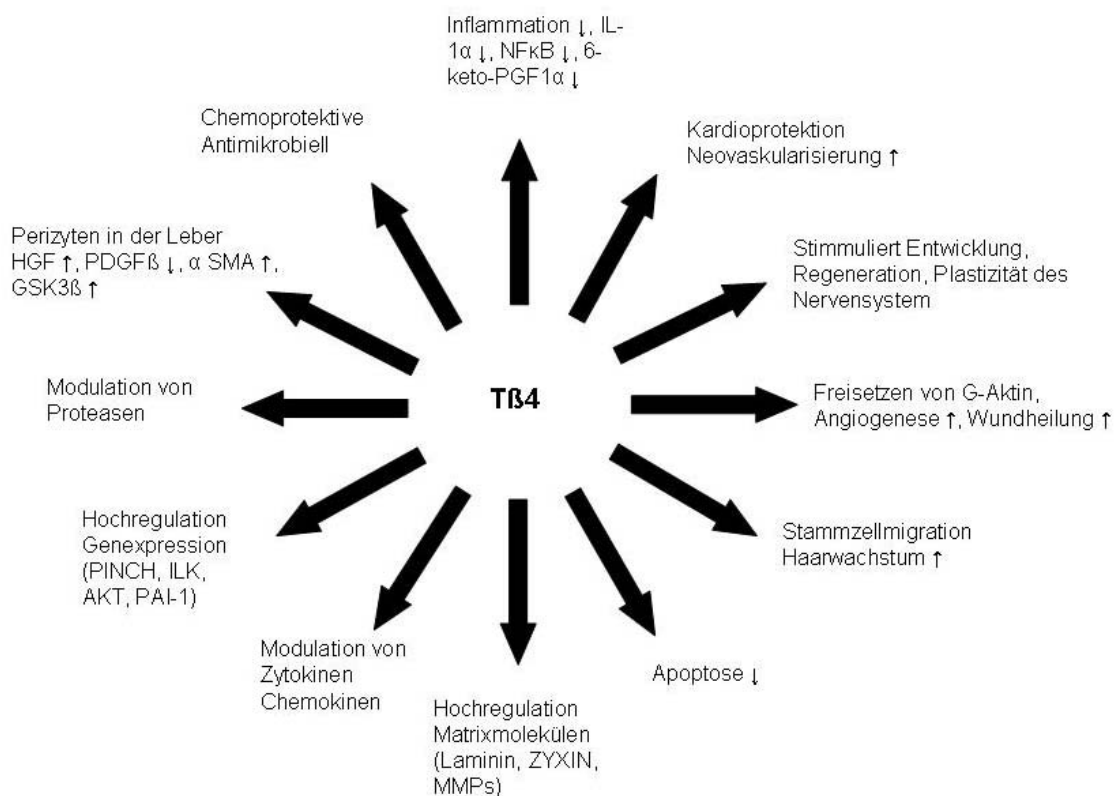


Abbildung 8: Überblick über die Funktionen des T $\beta$ 4 nach Hinkel (2009)<sup>79</sup>



Experimentelle Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten bereits einen Nutzen von Thymosin  $\beta 4$  in der Sepsis nachweisen,<sup>78,80</sup> der spezifisch mit der Stabilisierung von Kapillaren durch Perizyten einhergeht.<sup>78</sup>

## **1.8. Beeinflussung der vaskulären Strukturintegrität**

### **1.8.1. Morphologie des Gefäßes: endotheliale und vaskuläre Dysfunktion**

Arterien und Venen des menschlichen Körpers zeigen einen mehrschichtigen Aufbau. Von luminal nach extraluminal gliedern sie sich in eine Tunica intima, Tunica media und Tunica externa (auch adventitia genannt). Die innerste Schicht oder Intima, ist durch Endothelzellen aufgebaut. Sie tragen die Glycocalyx und sind die einzigen Zellen mit natürlich antithrombogener Wirkung. In großen Gefäßen, sitzen diesem einschichtigen Plattenepithel in einer dicken Tunica media mehrerer Schichten glatter Muskulatur auf. Sie beeinflussen den Tonus des Gefäßes, das heißt, dass sie über eine Veränderung des Widerstandes den Blutdruck und die Organperfusion beeinflussen können. Die äußerste Gefäßschicht oder Tunica adventitia stellt das Stützgewebe des Gefäßes dar. Sie enthält regulierende Nervenfasern und die sogenannten Vasa Vasorum, das heißt Gefäße, die die Gefäßschichten ernähren.

Die Beschaffenheit eines Gefäßes verändert sich kontinuierlich. Herznahe Arterien widerstehen der hohen Druckbelastung durch viele elastische Fasern, herzferne Arterien unterstützen den Kreislauf durch die Kontraktion ihrer vielen glatten Muskelfasern. Im weiteren Verlauf des arteriellen Systems nimmt die Zahl der glatten Muskelzellschichten ab und wird nach und nach durch eine Zellform ersetzt, die man Perizyten nennt. Perizyten sind Stützzellen des Endothels. Sie sind unregelmäßig und abluminal um die Endothelzellen verteilt und haben unter anderem parakrine Funktionen. Außerdem sind sie in der Lage durch ihre kontraktile Fasern die Mikrozirkulation zu steuern und haben daher ihren Stellenwert in der Hämodynamik. Sie zeigen eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu glatten Gefäßmuskelzellen (vSMC). Mittlerweile geht man davon aus, dass Perizyten und vSMC eine gemeinsame mesenchymale Vorläuferzelle haben und daher verschiedene Facetten eines einzelnen Zelltyps darstellen, der sich an die Gegebenheiten des Gefäßes anpasst<sup>76</sup>. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Stammzellen sich in der Zellkultur je nach Überwiegen des Mediators; PDGF- $\beta$  oder VEGF jeweils in Perizyten/glatte Muskelzellen oder in Endothelzellen differenzieren können. Dies legt eine enge Verwandtschaft von Perizyten, vSMC und Endothelzellen nahe.<sup>75</sup>

Einige Autoren beschreiben vSMC sogar als eine Unterform verschiedener heterogener Perizytengruppen<sup>77</sup>. Diese befänden sich laut dieser Autoren in den präkapillären Arteriolen und den postkapillären Venolen. An den Kapillaren selbst fänden sich nur nicht-kontraktile Perizyten. Dem Perizyten wird außerdem viel Differenzierungspotential unter anderem in Adipozyten oder auch Makrophagen nachgesagt, sodass er mehr als nur ein Gerüst für die Mikrozirkulation darstellt.<sup>75,76</sup>

Seine multiplen Fortsätze mit Hilfe derer er teils der Basalmembran und teils den Endothelzellen aufliegt,<sup>81</sup> ermöglichen dem Perizyten eine Barrierefunktion auszuüben. Die Dichtigkeit dieser Barriere beeinflusst maßgeblich physikalische Größen wie die Permeabilität des Gefäßes.

Trotz ihrer wichtigen Stützfunktionen wird die Rolle der Perizyten oft unterschätzt. So spricht man beispielsweise bei vielen Erkrankungen wie der Artherosklerose, der Hypertonie<sup>57</sup> oder der Sepsis

von endothelialer Dysfunktion. Um die Perizyten in der Ätiopathologie dieser Erkrankung miteinzubeziehen, wäre der Begriff „vaskuläre Dysfunktion“ eine Alternative.

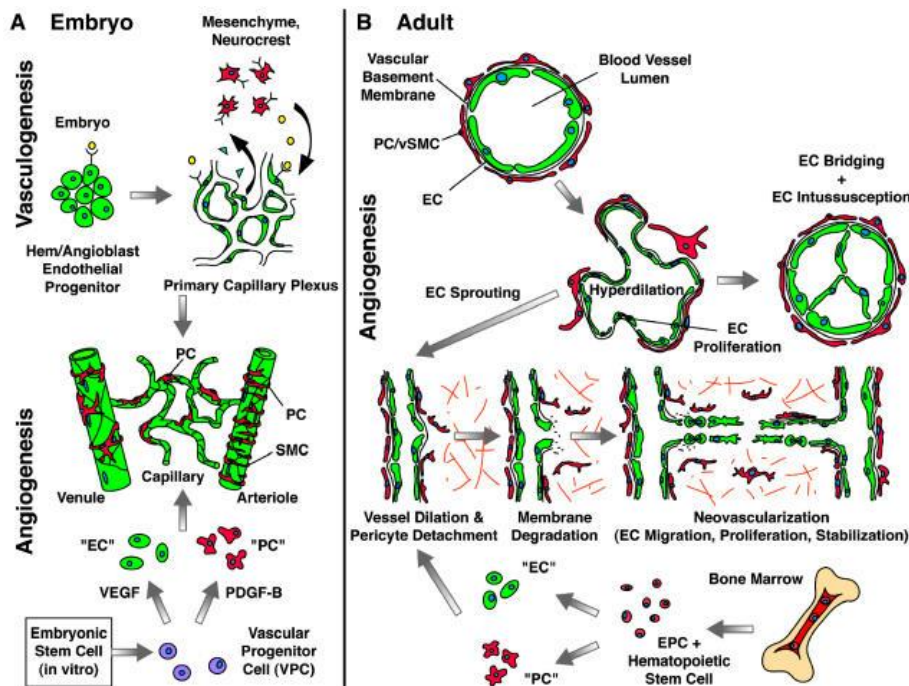


Abbildung 9: Ursprung der EC und PC nach Bergers *et al.*<sup>75</sup>

## 1.8.2. Definition von Permeabilität

Der menschliche Körper besteht zu mehr als der Hälfte aus Wasser. Dieses Wasser wird in verschiedene Kompartimente aufgeteilt. Man unterscheidet in aufsteigender Reihenfolge das transzelluläre Kompartiment mit knapp 2% des Wassers, das plasmatische Kompartiment mit ungefähr 7%, die interstitielle Flüssigkeit, die um die 30% des Körperwassers enthält und letztendlich das größte Flüssigkeitsreservoir: der Intrazellularraum. Zwischen diesen Kompartimenten finden Flüssigkeits- und Substanzverschiebungen statt. Hauptsächlich diffundieren diese Stoffe passiv zwischen diese Flüssigkeitsräume.<sup>52</sup>

Das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz von 1855 definiert die durch Diffusion transportierte Stoffmenge als direkt proportionale Funktion des Konzentrationsgefälles und der Oberfläche der Diffusionsmembran, die beide Räume trennt. Sie ist zum Kehrwert der Membrandicke proportional.

Das Fick'sche Gesetz lautet:<sup>52</sup>

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = D \frac{A}{d} \Delta c$$

Dabei sind:

- $\Delta Q/\Delta t$  die Ionenmenge pro Zeiteinheit, die über die Membran diffundiert in  $\text{mol s}^{-1}$

- D: Der Fick Diffusionskoeffizient in  $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
- d: die Dicke der Diffusionsmembran in m
- $\Delta c$ : das Konzentrationsgefälle in  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$
- A: die Membranoberfläche in  $\text{m}^2$

Indem  $\Delta Q/\Delta t$  durch die Diffusionsgeschwindigkeit  $J$  der Substanz ersetzt und die Permeabilität der Membran als  $D/d$  definiert wird, kann man die Permeabilität  $P$  (Einheit  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) physiologisch wie folgt definieren:

$$P = \frac{D}{d} = \frac{J}{A \cdot \Delta c}$$

Dabei bezeichnet  $P$  die Permeabilität eines bestimmten Stoffes an einer Membran. Zum Beispiel hätten Chloridionen eine Permeabilität von  $10^{-12} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  an einer Lipiddoppelschicht.<sup>52</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit stellen die jeweilig analysierten Gefäße die „Membranen“ dar, an denen die Permeabilität gemessen wird. Da es sich hierbei um ein komplexeres Gebilde handelt als eine einfache, proteinlose Doppellipidschicht, wurde der Begriff der relativen Permeabilität eingeführt. Dabei ist Wasser der Referenzstoff. Die relative Permeabilität ist eine dimensionslose Größe, die von der molaren Masse des Stoffes und seiner Ladung abhängig ist. Je größer der Stoff und je geladener er ist, desto niedriger ist seine relative Permeabilität. Natriumchlorid (NaCl) hat mit 0,96 zum Beispiel eine hohe relative Permeabilität, während Makromoleküle wie Tetramethylrhodamine isothiocyanate Dextrane (im Folgenden „TRITC-Dextrane“ genannt) oder Albumin mit jeweiligen Molekulargewichten von 4,4 kD und 69 kD schwer Membranen passieren und deren übermäßiger Extravasation meist eine endotheliale Dysfunktion zugrunde liegt.

**Tabelle 4: Einige Substanzen und ihre Permeabilität modifiziert nach Hick C., S.97ff.<sup>136</sup>**

Substanz	Molare Masse ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Relative Permeabilität
Wasser	18	1
Natriumchlorid (NaCl)	58,5	0,96
Harnstoff	60	0,8
Albumin	69000	$10^{-4}$

Hierbei müssen verschiedene Endothelformen unterschieden werden. In der Tat müssen verschiedene Gewebe zur Erfüllung ihrer Funktion verschiedene Endothelien vorweisen. Um ein konstantes Lungenödem zu verhindern, ist das Endothel der Lunge dicht, während die Milz ein fenestriertes Endothel aufweist, das sich durch große Poren charakterisiert um die Leukozytenmigration zu erleichtern. Der Permeabilitätskoeffizient  $P$  in  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  berücksichtigt dieses Phänomen und berechnet sich wie folgt:

$$P = \frac{D}{d} * \frac{F_p}{F}$$

Dabei ist  $F_p$  die Gesamtquerschnittsfläche der Poren und  $F$  die Gesamtquerschnittsfläche.

$\frac{F_p}{F}$  charakterisiert daher die Fenestrierung des Endothels.<sup>54</sup> Folglich werden größere Moleküle eher in der Blutbahn gehalten und können zum Beispiel im Falle von Albumin zu einem höheren kolloidosmotischen Druck führen. Unter anderem dieser Druck spielt in der sogenannten Starling Formel eine große Rolle.<sup>54</sup> Die Gleichung beschreibt einen Zusammenhang zwischen dem hydrostatischen Kapillardruck „ $P_c$ “ dem hydrostatischen interstitiellen Druck „ $P_{if}$ “, dem kapillären kolloidosmotischen Druck „ $\pi_c$ “, dem interstitiellen kolloidosmotischen Druck „ $\pi_{if}$ “ und dem aus dem Gefäß ausgepressten Volumen  $V$ .

Sie lautet:  $V = (P_c + \pi_{if} - P_{if} - \pi_c) \cdot K$

dabei ist K der Filtrationskoeffizient.

Diese Formel belegt die physiologische Ursache für die Permeabilität in den Arteriolen, dessen Transsudat von den Lymphgefäßen wieder aufgefangen wird. Der höhere arterioläre Druck filtriert Flüssigkeit in den Extrazellularraum. Zwar wird der Großteil dieser Flüssigkeit durch denselben Mechanismus wieder venös aufgenommen, dennoch beträgt das physiologische arterielle Tagesfiltrat ungefähr 2 Liter. Unter diesen Umständen werden nur Substanzen mit sehr kleinen molaren Massen filtriert. Selbst Substanzen wie das Evans Blue (mit einer molaren Masse von 961 Dalton) bleiben im physiologischen Zustand intravasal.

Physiologisch kommen Permeabilitätssteigerungen vor allem bei der Vaskulogenese (z.B. durch Ang<sub>2</sub>) oder der Leukozytenwanderungen vor. Andere Ursachen können neben Entzündungen und Verletzungen der Lymph- oder Blutgefäße auch Tumore, Allergien, Ödeme im Rahmen eines gesteigerten Perfusionsdrucks oder Aszites im Rahmen einer Leberinsuffizienz sein.

### 1.8.3. VEGF und Tsad: Konsequenzen einer Tsad Mutation

Nach bisherigen Erkenntnissen existieren sieben verschiedene „vascular endothelial growth Faktoren“ (VEGF)-Arten, die die Namen VEGF-A bis VEGF-F und PlGF (Plazentärer Growth Faktor) tragen (siehe Abbildung 10). Sie üben ihre Funktionen an drei verschiedenen Rezeptoren aus.<sup>84</sup>

Table 1 The Properties of Different VEGFs						
Ligand	Isoforms	Receptor	Solubility	Source in Adults	Biological Activities	Phenotype of Knockout Mouse
VEGF (VEGF-A)	VEGF-A <sub>121</sub> , VEGF-A <sub>165</sub> VEGF-A <sub>189</sub> , VEGF-A <sub>206</sub> (also VEGF-A <sub>138/145/162/165b</sub> have been described)	VEGFR-1 and -R-2, VEGF <sub>165</sub> binds to neuropilin-1 and -2, VEGF <sub>145</sub> neuropilin-2	VEGF <sub>121</sub> soluble, longer forms bind to heparan sulfates with increasing affinity	Almost all vascularized tissues, especially fenestrated and sinusoidal endothelium, up-regulated by ischemia (via HIF-1 $\alpha$ )	Vasculogenesis, angiogenesis, vascular homeostasis, vascular permeability and recruitment of bone marrow-derived cells	Loss of even single VEGF allele leads to embryonic lethality due to impaired vasculogenesis and angiogenesis
PlGF	PlGF <sub>131</sub> (PlGF-1), PlGF <sub>182</sub> (PlGF-2), PlGF <sub>203</sub> (PlGF-3)	VEGFR-1, PlGF <sub>182</sub> binds to neuropilin-1 and -2	PlGF <sub>131</sub> and PlGF <sub>203</sub> soluble, PlGF <sub>182</sub> binds to heparan sulfates	Placenta, thyroid, lung, and gut	Angiogenesis, monocyte migration, recruitment of bone marrow-derived cells, up-regulation of VEGF-A	Almost-normal phenotype and fertile with minor defects in vascular growth in pathological conditions
VEGF-B	VEGF-B <sub>167</sub> and VEGF-B <sub>186</sub>	VEGFR-1 and neuropilin-1	VEGF-B <sub>167</sub> binds to heparan sulfates, VEGF <sub>186</sub> soluble	Heart, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cells	Angiogenesis, recruitment of bone marrow-derived cells	Almost-normal phenotype with minor possible defects: reduced heart size, prolonged PQ-time, impaired recovery from ischemia
VEGF-C (VEGF-2)	Unprocessed and proteolytically processed ( $\Delta$ N $\Delta$ C) forms	VEGFR-2, -R-3, and neuropilin-2, processing increases receptor affinity	Soluble	Neuroendocrine organs, lung, heart, kidney, and vascular smooth muscle cells	Development of lymphatics and lymphangiogenesis, angiogenesis	Lethal because of impaired development of lymphatics
VEGF-D	Unprocessed and proteolytically processed ( $\Delta$ N $\Delta$ C) forms	VEGFR-2 and VEGFR-3, processing increases receptor affinity	Soluble	Neuroendocrine organs, lung, heart, skeletal muscle, intestine, and vascular smooth muscle cells	Lymphangiogenesis and angiogenesis	Normal
VEGF-E	—	VEGFR-2 and neuropilin-1	Soluble	Virus-derived	Angiogenesis	—
VEGF-F	—	VEGFR-2	Binds to heparan sulfates	Snake venom	Angiogenesis and vascular permeability	—

HIF = hypoxia-inducible factor; PlGF = placental growth factor; VEGF = vascular endothelial growth factor.

Abbildung 10: Funktionen verschiedener VEGF-Liganden nach Yla-Herttula S.<sup>84</sup>

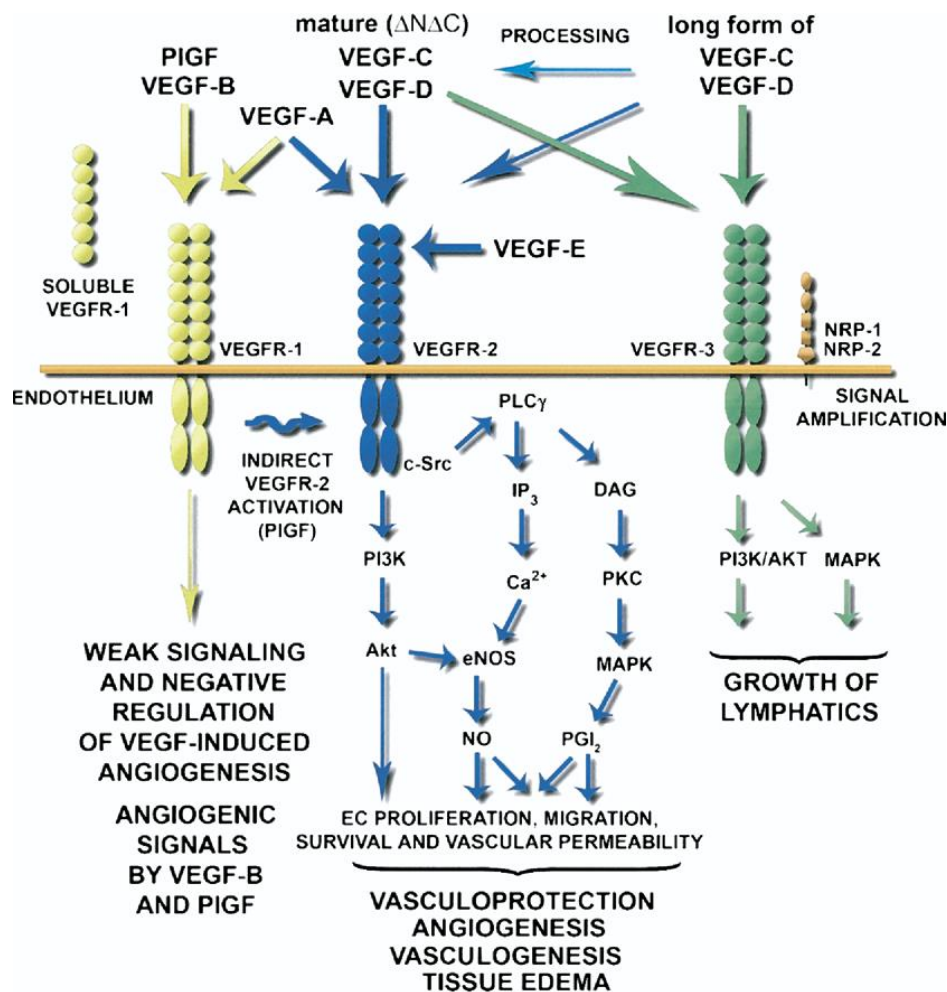


Abbildung 11: Überblick über den VEGF Stoffwechsel des Endothels nach Yla-Herttula S.<sup>84</sup>

Wie die Tabelle 5 verdeutlicht, ist im menschlichen Organismus das VEGF-A durch seine starke Bindung an den VEGF2-Rezeptor unerlässlich, kann aber auch an den VEGF-1-Rezeptor binden (siehe Abbildung 11). Innerhalb des VEGF-A existieren verschiedene Splicing Produkte, die zwischen 121 und 206 Aminosäuren besitzen, mannigfaltige Teilfunktionen haben und in verschiedenen Geweben exprimiert werden.<sup>85</sup>

**Tabelle 5: VEGF und Angiopoietine: Liganden und Rezeptoren modifiziert nach Anisimov *et al.*<sup>82,83</sup>**

Ligand	Funktionen	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	TIE 1	TIE 2
<b>VEGF A</b> = „VEGF“	Permeabilitätserhöhung/, Gefäßdurchlässigkeits- steigerung Gewebsschwellung, Gewebsin- flammation	+(„decoy function“)	++	-	-	-
VEGF B	Koronare Gefäßproliferation	+	-	-	-	-
VEGF C	Lymphangiogenese	-	+	+	-	-
VEGF D	Ähnliche Wirkung wie VEGF-C	-	+	+	-	-
VEGF E	„schwächer“ wirkendes VEGF	-	+	-	-	-
ANG 1	Gefäßstabilisierung, Abnahme der Gefäßpermeabilität Inhibi- tion des Leukozytenrekrui- ments, Antagonisierung der VEGF Signalwege	-	-	-	+	+
ANG 2	Antagonist des ANG 1 (außer in Lymphgefäßen), vor allem an Orten der Gefäßneubildung exprimiert.	-	-	-	+	--

Die Expression von VEGF wird unter anderem durch den Hypoxie induzierten Faktor (HIF) gesteigert. So führt eine andauernde Minderversorgung von Geweben mit Sauerstoff zu einer durch VEGF-A induzierten Neovaskularisation.<sup>86,87,88</sup>

Die VEGF Synthese kann aber auch durch verschiedene Zytokine wie PDGF, FGF (Fibroblast growth factor) EGF (Epidermal growth factor) gefördert werden, die damit eine proangiogene Wirkung in-  
nehaben.<sup>90,91</sup>

Um diese Gefäßproliferation zu gewährleisten, bewirkt VEGF-A, das am stärksten die VEGFR1 und VEGFR2 Rezeptoren (VEGFR1 und VEGFR2) aktiviert, eine Veränderung der Gefäßphysiologie. Die endotheliale Apoptose wird verhindert, ihre Proliferation und Ringformation gefördert. Eine Vasodilatation durch NO und eine Permeabilitätserhöhung sind dafür notwendig. Diese durch VEGF-A hervorgerufenen Wirkungen können durch die Proteine Neuropilin-1 und 2 verstärkt werden<sup>90</sup>. Die Permeabilitätssteigerung beruht zu großen Teilen auf eine Modifikation der Cadherinfunktion in den Endothelzellen.<sup>117</sup> Cadherine (Calcium dependant adhesion) sind Proteine, die in Abhängigkeit von Kalziumionen Zellverbindungen stabilisieren. Prominente Vertreter sind die N- und VE-Cadherine. Neurales (N-)Cadherin ist vor allem im Nervensystem vertreten, während VE-(vaskulo-endotheliale-) Cadherine Endothelzellen verbinden. Hohe VEGF-Spiegel können nachweislich diese Verbindungen auflö-  
ckern.<sup>117</sup>



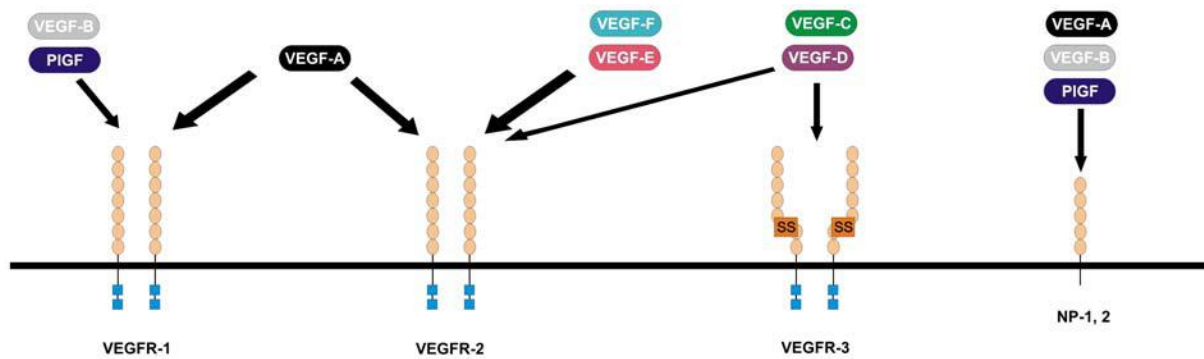


Abbildung 12: Neuropilinrezeptoren und VEGF- Stoffwechsel nach Otrrock K.<sup>90</sup>

Viele bisher unbekannte Funktionen der VEGF-Familie sind aktuell Gegenstand diverser Fachrichtungen wie der Onkologie, der Ophthalmologie oder der Endokrinologie. Letzterer Fachbereich konnte zum Beispiel zeigen, dass VEGF-A das Gleichgewicht zwischen braunem und weißem Fettgewebe und damit über die Thermoregulation und dem Körpergewicht das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen beeinflussen kann<sup>89</sup>. VEGF-A ist außerdem ein wichtiger Mediator der Wundheilung.<sup>96</sup>

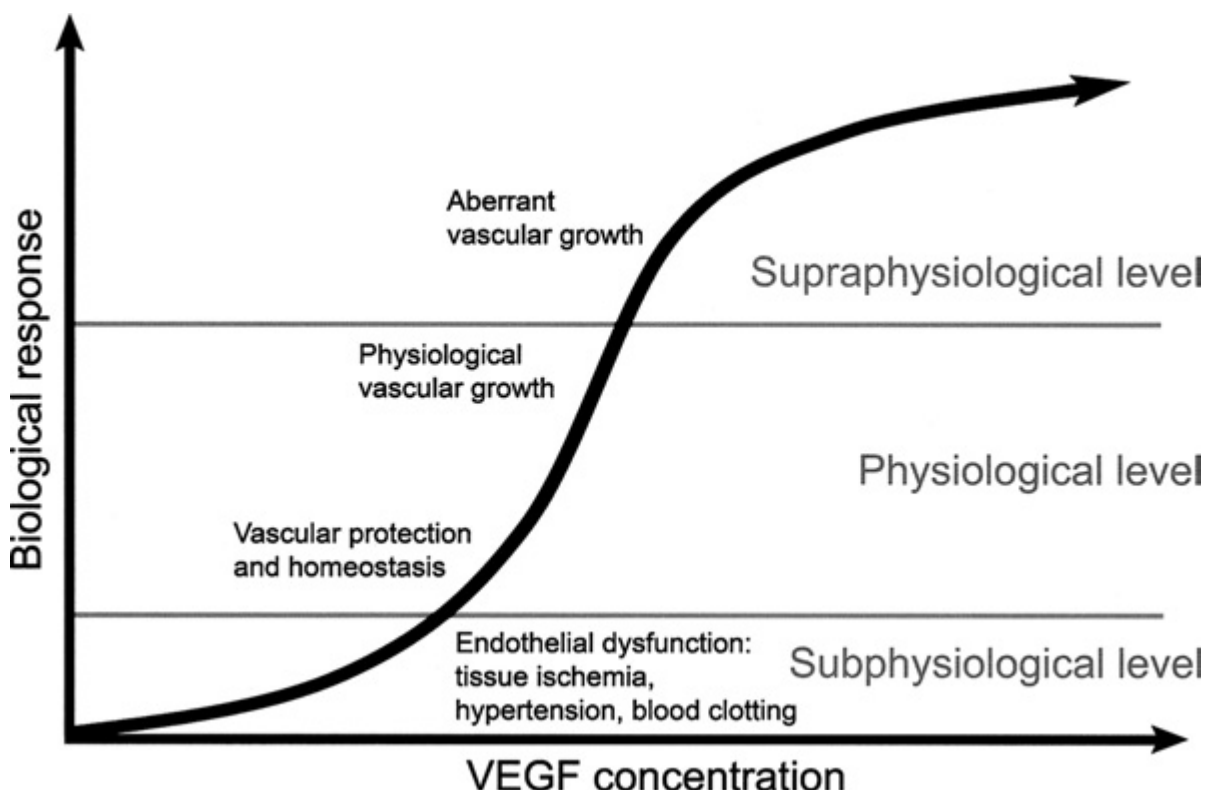


Abbildung 13: Die VEGF-A Wirkung ist von der lokalen Konzentration abhängig nach Ylä-Herttuala<sup>92</sup>

Neben der Antagonisierung der proangiogenen und permeabilitätssteigerenden Wirkungen des VEGF-A wie sie beispielsweise in der Krebstherapie mit dem Antikörper Bevacizumab stattfindet, steigt das Interesse an einer Modulierung des VEGF-Pathways in der Kardiologie und der Angiologie.

Auch in der Sepsis wird der Stellenwert des VEGF untersucht. Insgesamt scheinen hohe VEGF Konzentrationen (siehe

Abbildung 13) sich aufgrund des endothelialen Stabilitätsgewinns und trotz der höheren Permeabilität (und der noch nicht völlig geklärten pro-inflammatorischen Funktion) günstig auf die Sepsis auszuwirken.<sup>55</sup> Wenngleich die endotheliale Stabilität in der Sepsis erwünscht ist, stellt sich die Frage nach der Rolle des VEGF als Mediator der Permeabilität. Zu diesem Zweck entdeckten Claesson-Welsh et al.<sup>83</sup> die Möglichkeit Mäusereihen gezielt zu modifizieren, um alleine die VEGF induzierte Permeabilitätssteigerung zu verhindern. Die Aktivierung des VEGFR2 führt zu einer Phosphorylierung des Tyrosins an der Stelle Y951. An diese Stelle bindet das Protein Tsad (T-cell specific adaptor), dass über weitere Interaktionen mit anderen Proteinen die Permeabilitätserhöhung durch VEGF hervorruft. Eine gezielte Mutation des Tsad führt daher zu einer gestörten Permeabilitätserhöhung ohne andere lebenswichtige Funktionen des VEGF zu beeinflussen.<sup>93</sup>

Dies ermöglicht eine gezielte Untersuchung des Stellenwertes der Permeabilität in der Sepsis.

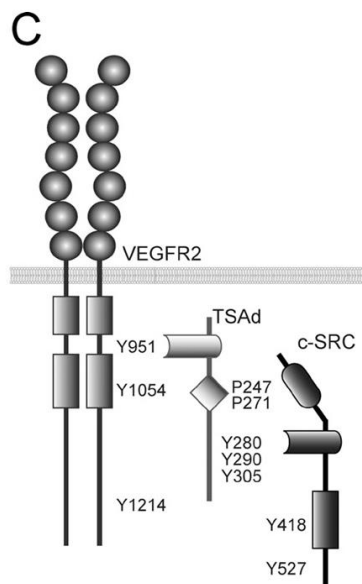


Abbildung 14: Das VEGFR<sup>2</sup>-Tsad-c-SRC-Konstrukt nach Sun Z. et al.<sup>83</sup>



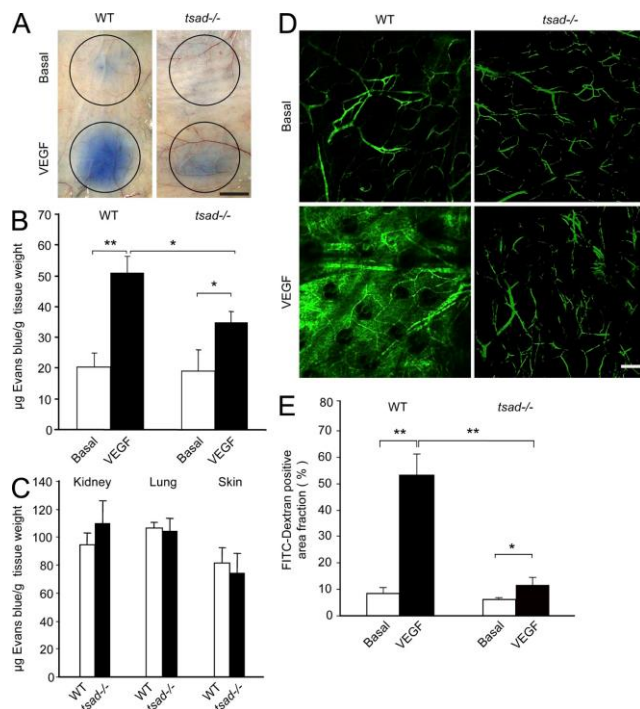


Abbildung 15: Das Tsad-Konstrukt als Mediator der Permeabilität nach Sun Z. *et al.* <sup>83</sup>

Die Messung der relativen Gewebefluoreszenz extravasierter TRITC-Dextrane ermöglichte es Sanchez *et al.* <sup>69</sup> zu zeigen, dass spezifische Punktmutationen nicht die einzige Möglichkeit sind die VEGF induzierte Permeabilität zu senken. Sie konnte in Ihrem Experiment zeigen, dass Sphingolipide wie das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und sein Analogon FTY-720P ebenfalls die Gefäßextravasation senken konnten.

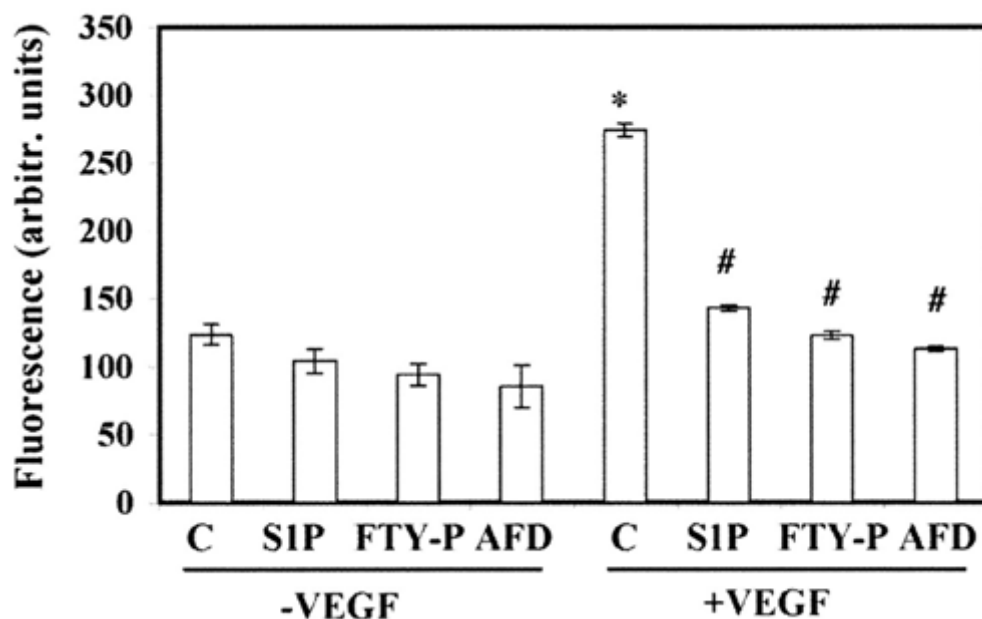


Abbildung 16: Partieller Antagonismus der VEGF induzierten Permeabilitätserhöhung durch S1P und seine Analoga nach Sanchez *et al.* <sup>69</sup>

## 1.9. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und das Sphingolipidsystem (S1P/SPH/CER/C1P)

### 1.9.1. Synthese und Stellenwert der Sphingolipide

S1P und seine Vorläufersubstanz SPH sind biochemisch gesehen Substanzen, die innerhalb der Gruppe der chemisch recht homogenen Sphingolipide eingeordnet werden. Sphingolipide sind ubiquitär vorkommende Lipide. Neben ihren wichtigen Stützfunktionen in Zellmembranen hat diese Gruppe mit über 300 bisher bekannten Derivaten zahlreiche Vertreter in der Blutbahn, die wichtige Stoffwechselwege regulieren<sup>115;116;147;148</sup>. Ihnen ist die Sphingosingruppe gemein, die entweder aus dem Ceramidmetabolismus oder über eine Reaktion von Serin mit Fettsäuren entsteht.<sup>99</sup>

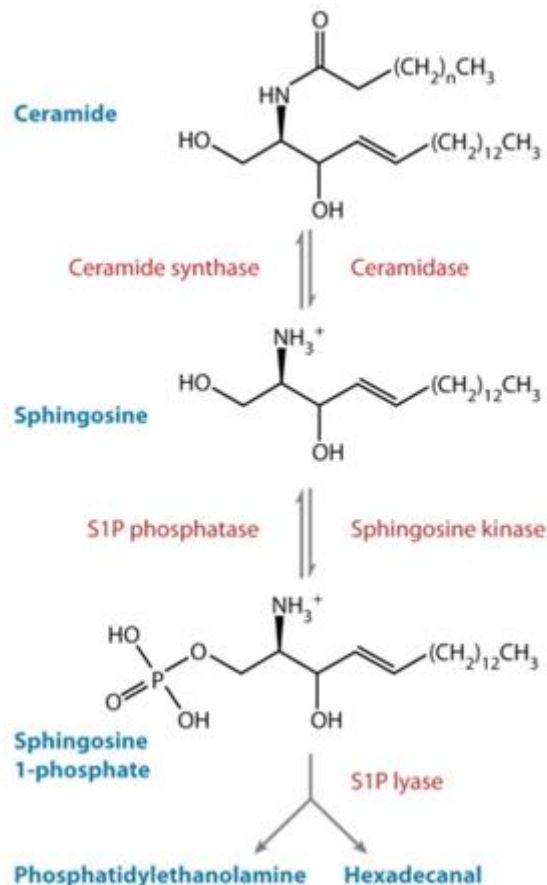


Abbildung 17: Ausschnitt aus dem Sphingosinstoffwechsel nach Rosen, H. et al., 2009 Annu Rev Biochem

In der Tat wird das S1P durch die S1P Kinase aus SPH synthetisiert und entweder reversibel durch die S1P Phosphatase oder irreversibel durch die S1P Lyase abgebaut. Eine intraperitoneale Injektion von SPH führt dosisabhängig zu einer Induzierung der SPHK und damit zu steigenden S1P Spiegeln.<sup>64</sup>

Schon 1991 zeigten Zhang et al.,<sup>61</sup> dass die Gabe von SPH konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der S1P Spiegel führt,<sup>61,62</sup> beide Substanzen über einen Kalziumeinstrom eine Zellproliferation hervorrufen und andere Wachstumsfaktoren diese Zellproliferation potenzieren können. Allerdings führt die simultane Gabe beider Substanzen zu keinem additiven/synergistischen Effekt. Laut den Autoren ist die Wirkung von SPH/S1P auf die DNA Synthese in Fibroblastenkulturen (bei 50 µM SPH/ 2 µM S1P) stärker als andere anabole Substanzen wie Insulin oder EGF in einer vergleichbaren Konzentration.<sup>61</sup> S1P ist dabei potenter als SPH.

Vor Zhangs Veröffentlichung hatte Ghosh et al. 1990 gezeigt,<sup>140</sup> dass SPH/S1P zu einer Kalziummobilisierung führt. Zhang konnte beweisen, dass dieses Kalzium nicht von extrazellulär, sondern von zell-internen Speichern freigesetzt wird. Daraufhin werden in der Zelle Stoffwechselwege eingeschaltet, die anti-apoptotisch und proliferativ wirken. Um zu verhindern, dass eine zu starke Proliferation stattfindet, hat S1P einen Antagonisten aus derselben Stoffgruppe, das Ceramid, was pro-apoptotisch und anti-proliferativ wirkt. Auch das Ceramid kann durch die Ceramidkinase zum Ceramid-1-Phosphat (C1P) metabolisiert werden, dessen Funktionen sich von der Ausgangssubstanz grundlegend unterscheiden und eher den Funktionen des S1P ähneln. Das Gleichgewicht zwischen dem pro-apoptotisch und zellzyklusarretierend wirksamen Ceramid einerseits und seinen anti-apoptotisch wirksamen Metaboliten Ceramid-1-Phosphat (C1P), Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat spielt daher für die Zellproliferation eine bisher unterschätzte Rolle und gerät immer mehr in den Fokus verschiedener Disziplinen wie der regenerativen Chirurgie und der Tumorforschung.<sup>63</sup>

Es wird aktuell davon ausgegangen, dass ein Großteil des extrazellulären S1P maßgeblich aus Blutzellen synthetisiert wird und daher einen intrazellulären Ursprung hat. Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Endothelzellen und vSMC können nachweislich S1P ins Blut freisetzen,<sup>99</sup> tun dies aber in keinem anderen Flüssigkeitskompartiment in diesem Ausmaß.<sup>101</sup>

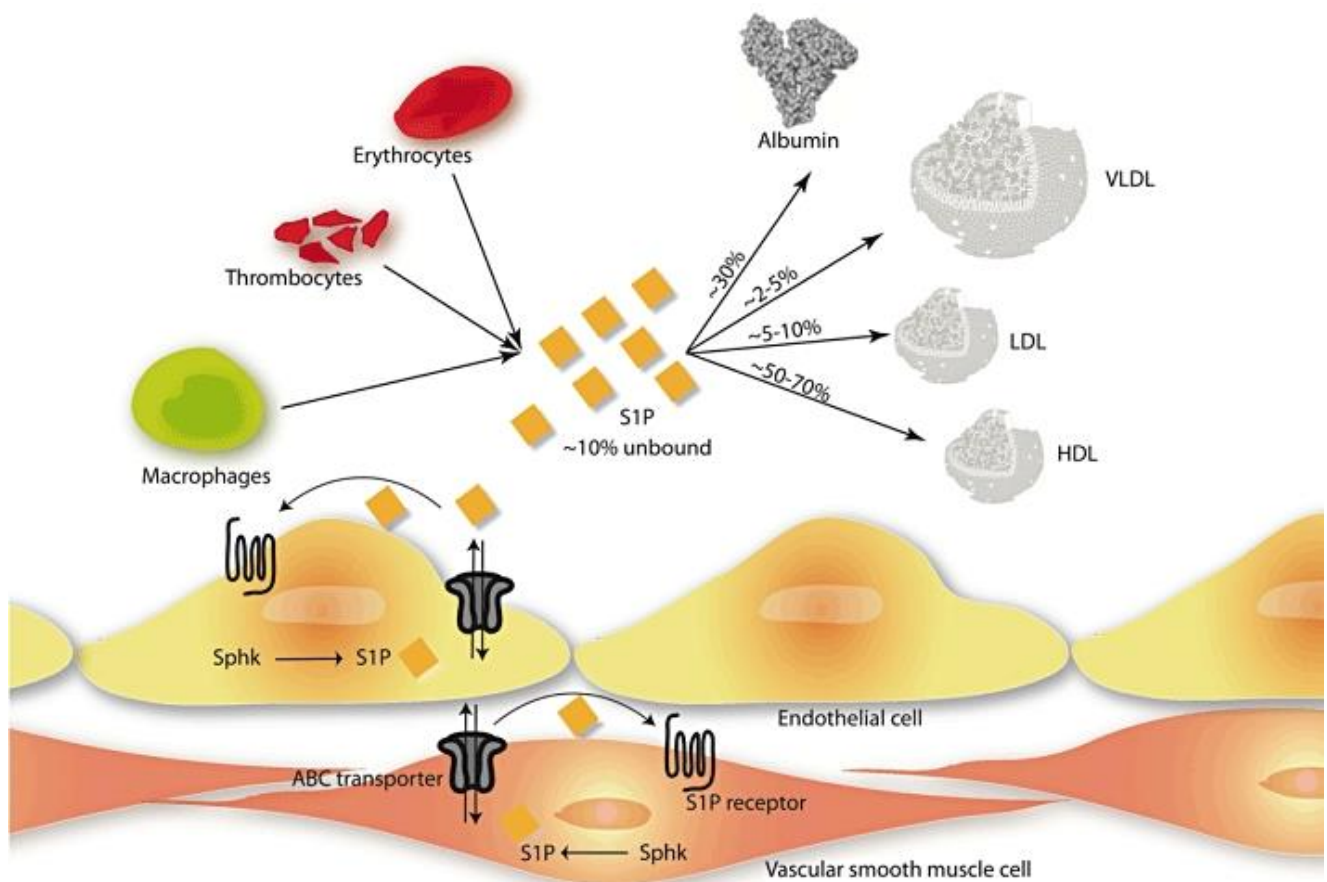


Abbildung 18: Speicherformen des S1P nach Schuchardt *et al.*<sup>99</sup>

Das S1P kann auch extrazellulär zurück in SPH dephosphoryliert werden, anschließend u.a. vom Endothel der Pulmonalarterien aufgenommen werden, um nach erfolgter intrazellulärer Rephosphorylierung die Apoptose zu verhindern und die Permeabilität zu regulieren.<sup>138,139</sup> Somit entsteht ein SPH-S1P Zyklus.

Im Blutplasma finden sich allerdings keine S1P metabolisierenden Enzyme.<sup>100</sup> Es bildet sich dadurch ein chemotaktisch wirksamer Gradient zum Blut aus.

Die „de novo Synthese“ von S1P ist daher von allem von dem zellulären Kompartiment des Blutes und der endothelialen Integrität abhängig. Dies erklärt auch die große Schwankungsbreite bei S1P-Spiegelbestimmungen. Ist die Blutabnahme (z.B. durch zu langes Stauen) unsachgemäß, sind die Spiegel durch einen systematischen Fehler falsch hoch.

Beim Menschen liegen die Blutplasmaspiegel von S1P je nach Autor bei 100-900 nM und die Serumspiegel zwischen 400 und 1100 nM.<sup>56,57,103</sup> Bei der Maus bewegen sich die Plasmaspiegel mit  $471 \pm 59$  nM bis  $1,35 \pm 0,19$   $\mu$ M in einem etwas höheren Bereich.<sup>103</sup>

Das entspricht beim Menschen bei einer molaren Masse von  $379,472 \text{ g mol}^{-1}$  einer Konzentration von 0,15 bis 0,42  $\text{mg L}^{-1}$ . Mit ungefähr 10% liegt nur ein Bruchteil dieser Menge als freies S1P vor.<sup>58</sup>

Der Großteil ist hauptsächlich an Serumproteine wie HDL (50-70%), Albumin und LDL, bzw VLDL gebunden.<sup>59,60</sup>

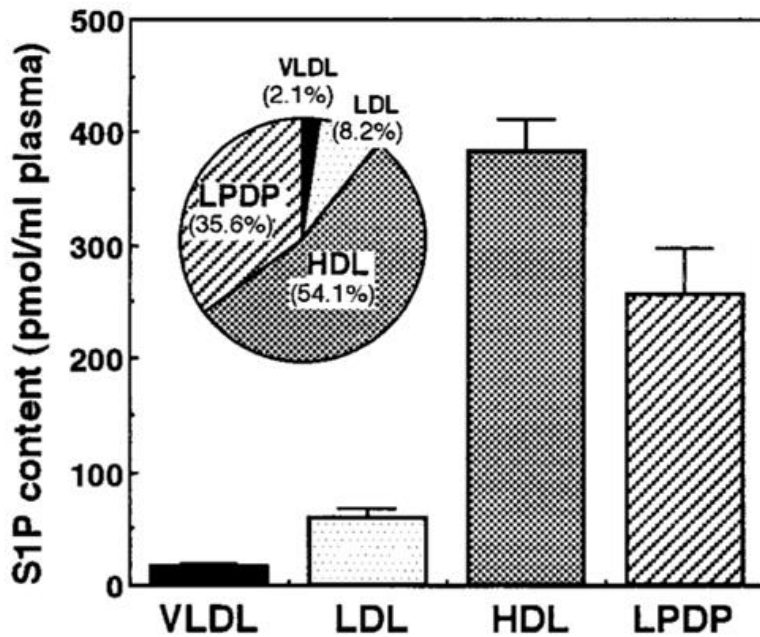


Abbildung 19: S1P Fraktionen im Blutplasma nach Murata et al.<sup>59</sup> und Okajima et al.<sup>60</sup>

Die große Schwankungsbreite und der Unterschied in Plasma und Serumspiegel sind darin begründet, dass aktivierte Thrombozyten S1P freisetzen. Dieser Umstand, gepaart mit der starken Bindung an Lipoproteinen einer kurzen Halbwertszeit von 15 Minuten<sup>110</sup> und die Existenz einer noch nicht identifizierten aber thermolabilen und rezeptormodulierenden Substanz,<sup>59,60,101</sup> bewegt viele Autoren dazu, zu glauben, dass die realen S1P-Spiegel in vivo viel niedriger und sehr engmaschig reguliert sind. Wenn man in der Tat von dem von Książek et al. gemessenen Spiegel ausgeht,<sup>103</sup> der sich mit 100 nM bis 500 nM im unteren Bereich der Wertespanne der Literatur befindet, dann stellt die Konzentration des freien S1P mit 10% ungefähr 10 nM bis 50 nM dar. Ein freier Spiegel von 50 nM entspricht einem Vielfachen der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) der verschiedenen S1P-Rezeptoren zwischen 2-30 nM (siehe Kapitel 1.9.2.), sodass davon auszugehen wäre, dass alle zur Zeit bekannten Rezeptoren beinahe gesättigt wären. Daher wären Ruhespiegel von 10 nM denkbar.

Dieser Rückschluss ist nur möglich, weil der S1PR das S1P nicht verstoffwechselt, sodass man damit  $K_d$  der Michaeliskonstante  $K_m$  gleichsetzen kann.

Innerhalb des S1P muss nicht nur zwischen freien und an Lipoprotein gebundenem S1P sondern auch zwischen intra und extrazellulärem S1P unterschieden werden, da beide Formen konkurrierende Eigenschaften an S1PRs haben können.

Außerdem kann die beobachtete Wirkung je nach Zielgewebe variieren oder gar antagonistisch zu einem anderen Gewebe sein. Beispielsweise wirkt das als systemisch proinflammatorisch beschriebene C1P in der Lunge lokal anti-inflammatorisch.<sup>64</sup>

Die Expression der „vascular cell adhesion molecules“ (CD106/ vCAM) wird durch freies S1P gefördert, während an HDL gebundenes S1P diesen Prozess inhibiert. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Bindung von Blutzellen an der Endothelzellwand. Außerdem ist eine atherogene Wirkung von hohen freien S1P Spiegeln beschrieben, während ein hohes HDL-S1P protektiv wirken kann. Bei atherosklerotischen Erkrankungen wurde bereits der isolierte Mehrwert eines hohen HDL Spiegels nachgeschwiesen. Um einen Confoundereffekt auszuschließen, zeigten Nofer et al., dass der positive

Effekt des HDL abnimmt, wenn die S1P<sub>3</sub> Rezeptordichte abnimmt.<sup>105,107</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus mehreren Gründen besonders auf das SPH/S1P-System eingegangen. Neben den gerade beschriebenen proliferativen Effekten auf Fibroblasten, wird die S1P-synthetisierende SphK von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  oder auch pro-angiogenetischen Mediatoren wie VEGF in der Sepsis induziert.<sup>65</sup> Im Sinne eines Regelkreises modulieren hohe S1P Spiegel die TNF- $\alpha$  Wirkung.<sup>106</sup> Das bedeutet, dass eine Gabe von SPH in der Sepsis zu einem vermehrten Anfall von S1P führen würde. Im weiteren Verlauf wird daher die Frage geklärt, inwiefern andere Zellpopulationen, die in der Sepsis besonders stark untergehen, durch die Induktion des SPH/S1P-Systems profitieren können.

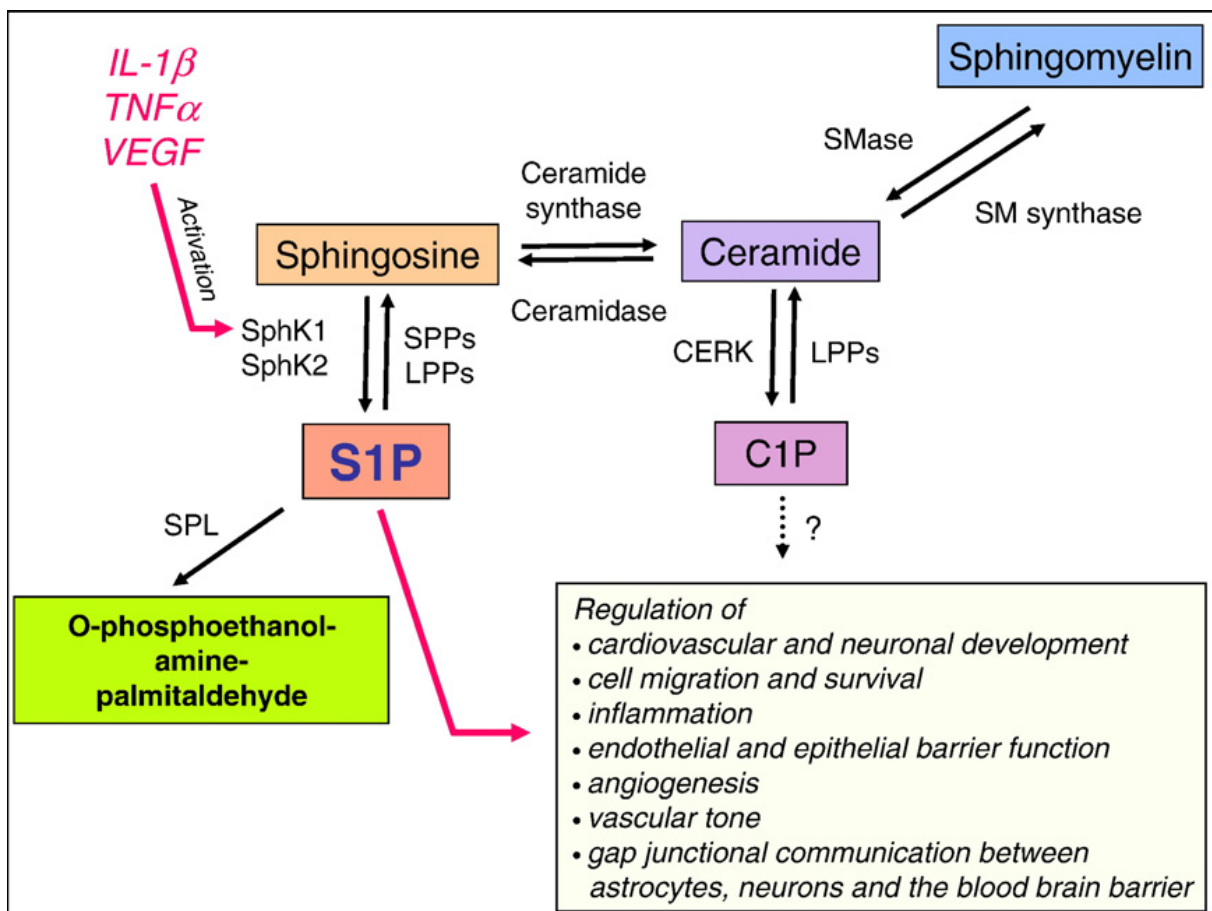
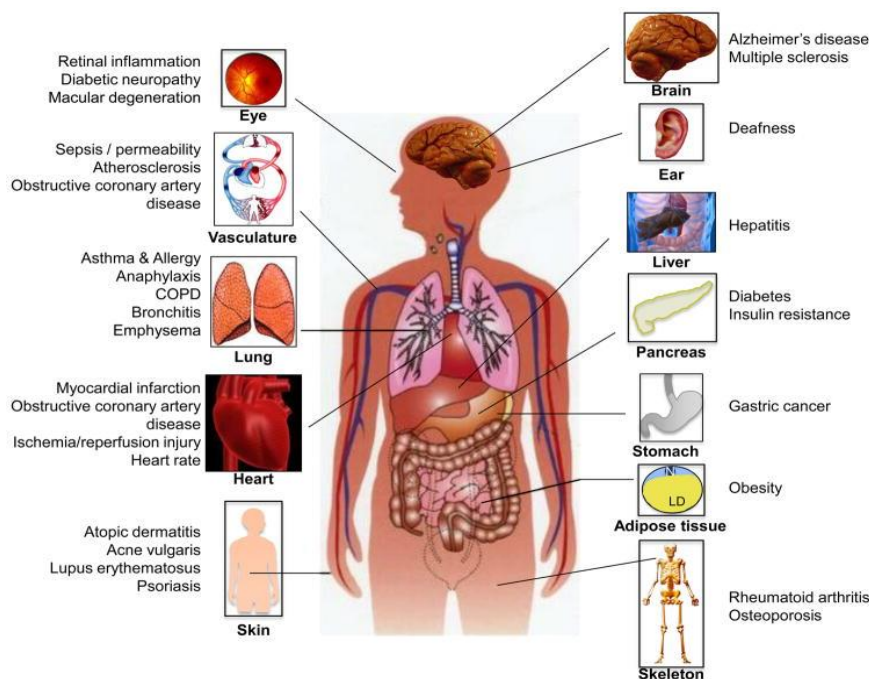


Abbildung 20: Beeinflussung der S1P/SPH Verhältnisses durch Interleukin, VEGF und TNF- $\alpha$  nach Brinkmann V,<sup>65</sup>

Damit rückte das potentere S1P in den Fokus der hiesigen Untersuchungen, da diese Substanz bei starker Inflammation aus SPH vermehrt synthetisiert wird. Es stellt sich dabei die Frage, welche Rolle erhöhte S1P Spiegel bei Inflammation im Allgemeinen und besonders bei einer fulminanten Form der Entzündung, der Sepsis, spielt.

Daher empfiehlt es sich einen kurzen Überblick über die diversen Funktionen dieses Lipidmetaboliten zu erstellen.



**Abbildung 21:** Die Beeinflussung des S1P-Stoffwechsel ist bei vielen Krankheitsbildern von Bedeutung nach Spiegel <sup>135</sup>

Aufgrund der vielen Funktionen, die S1P in der Embryogenese, der Organogenese (siehe Abbildung 21) und der Homöostase innehat, beschränkt sich der folgende Absatz nur auf einen Auszug der bekannten und im Rahmen der Sepsis wichtigen Funktionen des S1P.

### 1.9.2. S1P: Rezeptoren, Signalwege und Funktionen

Nach der aktuellen Lehrmeinung sind fünf S1P Rezeptoren bekannt, die je nach Nomenklatur S1PR1-5 (auch S1P<sub>1-5</sub>) oder auch EDG genannt werden.

Diese Rezeptoren unterscheiden sich nebst ihren Funktionen zum Teil auch stark in ihrer Affinität zum Liganden S1P. Das bedeutet, dass verschiedene S1P Konzentrationen teils zu antagonistischen Effekten führen können. Während die genauen Funktionen von S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>3</sub> besser beschrieben sind, bleiben S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> weiterhin Gegenstand der immunologischen<sup>108</sup> und neurologischen<sup>109</sup> Forschung.

Daraus ergibt sich folgende Tabelle über die bisher nachgewiesenen Funktionen:

**Tabelle 6: Übersicht der S1P Rezeptoren, modifiziert nach Brinkmann<sup>56,65</sup>**

Rezeptor-Subtyp	Affinität	Vorkommen	Beschriebene Hauptfunktionen (Ausschnitt)
S1P <sub>1</sub>	8 nM	Immunzellen: Eosinophile, Mastzellen, Lymphozyten, Thymozyten	Migration entlang des Gradienten, Lymphozytenauswanderung aus dem Lymphknoten, Zellüberleben (auch bei anderen Zelltypen) Thymozytenauswanderung aus dem Thymus B und T-Lymphozyten: Verlassen des Lymphknotens und verminderte Adhäsion am Endothel
		Dendritische Zellen	Verminderte Migration in die Lymphknoten
		Endothelzellen	Angiogenese Senkung der Gefäßpermeabilität und Verstärkung der endothelialen Barrierefunktion Vasodilatation und eNOS Aktivierung an EC fraglich bei S1P <sub>1</sub> : Vasokonstriktion, Blutdrucksteigerung bronchiale Hyperreagibilität, myometriale Konstriktion an glatten Muskelzellen: möglicher unkompetitiver Agonismus an muskarinerger AC Rezeptoren
		Atriale Myozyten	Bradykardie (Wirkung an atrialen Myozyten)
		ZNS	Embryologische Neurogenese Astrogliale Activation und Proliferation Gap junction inhibition an der Blut-hirn-Schranke
S1P <sub>2</sub>	20-27 nM	Diverse Zelltypen	Migrationsverhinderung von Zellen (Gegenspieler von S1P <sub>1</sub> und S1P <sub>3</sub> )
		Endothelzellen	Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Verminderung der endothelialen Barrierefunktion (Gegenspieler von S1P <sub>1/3</sub> ) Vasokonstriktion, Blutdrucksteigerung bronchiale Hyperreagibilität, myometriale Konstriktion an glatten Muskelzellen (Agonismus mit S1P <sub>1</sub> und S1P <sub>3</sub> ) möglicher nicht-kompetitiver Agonismus an muskarinerger AC Rezeptoren
		Mastzellen	Degranulation (noch nicht gesichert)
S1P <sub>3</sub>	23-26 nM	Diverse Zelltypen	Migration von Zellen Zellüberleben
		Endothelzellen	Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Verminderung der endothelialen Barrierefunktion Bradykardie Vasodilatation und eNOS Aktivierung durch EC Vasokonstriktion, Blutdrucksteigerung bronchiale Hyperreagibilität, myometriale Konstriktion an glatten Muskelzellen: möglicher unkompetitiver Agonismus an muskarinerger AC Rezeptoren
		ZNS	Astrogliale Activation und Proliferation Gap junction Inhibition an der Blut-Hirn-Schranke
S1P <sub>4</sub>	13-63 nM	Lymphatisches System, glatte Muskulatur des Bronchialsystems	Weitesgehend unbekannte Funktionen
S1P <sub>5</sub>	2 nM	Oligodendrozyten und weiße Substanz des ZNS	Weitesgehend unbekannt, eventuelle Modulierung der Oligodendrozytenfortsätze



**Tabelle 7: Auswahl wichtiger und möglicher Funktionen der S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> Rezeptoren, modifiziert nach Brinkmann <sup>65</sup>**

Wichtigste Funktionen auf Gefäße	S1P <sub>1</sub>	S1P <sub>2</sub>	S1P <sub>3</sub>
Migration (diverse Zelltypen) <i>Disanza et al., 2005; Lepley et al., 2005</i>	+	-	+
Zellüberleben (diverse Zelltypen) <i>Chalfant &amp; Spiegel, 2005; Chun &amp; Rosen, 2006</i>	+	X	+
Migration (lymphatisches System) <i>Matloubian et al., 2004; Kabashima et al., 2006; Bolick et al., 2005; Whetzel et al., 2006; Lan et al., 2005; Idzko et al., 2006; Jolly et al., 2004, 2005; Roviezzo et al., 2004</i>	+	X	x
Bradykardie (atriale Myozyten) <i>Bunemann et al., 1995; Mazurais et al., 2002; Forrest et al., 2004</i>	+	X	+
Vasokonstriktion (glatte Muskelzellen) <i>Coussin et al., 2002; Salomone et al., 2003; Zhou &amp; Murthy, 2004; Forrest et al., 2004; Hu et al., 2006; Leiber et al., 2007; Kume et al., 2007</i>	+?	+	+
Blutdruckerhöhung (glatte Muskelzellen) <i>Coussin et al., 2002; Salomone et al., 2003; Zhou &amp; Murthy, 2004; Forrest et al., 2004; Hu et al., 2006; Leiber et al., 2007; Kume et al., 2007</i>	+?	+	+
bronchiale Hyperreagibilität (glatte Muskelzellen) <i>Coussin et al., 2002; Salomone et al., 2003; Zhou &amp; Murthy, 2004; Forrest et al., 2004; Hu et al., 2006; Leiber et al., 2007; Kume et al., 2007</i>	+?	+	+
Verstärkung der endothelialen Barriere (EC) <i>Singleton et al., 2005; Gon et al., 2005; Singleton et al., 2006; Sanna et al., 2006; Gon et al., 2005; Singleton et al., 2006; Sanchez et al., 2007</i>	+	-	-
Angiogenese (EC) <i>Allende &amp; Proia, 2002; Allende et al., 2003</i>	+	X	X
Vasodilatation über eNOS Aktivierung (EC) <i>Dantas et al., 2003; Igarashi et al., 2003; Nofer et al., 2004; Theilmeier et al., 2006</i>	+	X	+
+=Verstärkung der Wirkung    -=Abschwächung der Wirkung    x= nicht beschriebene oder keine Wirkung    ?=fragliche Wirkung			

Neben den Vorkommen im lymphatischen System (S1P<sub>4</sub>) und im ZNS (S1P<sub>5</sub>) beschreiben einige Autoren ein Vorkommen von S1P<sub>4/5</sub> in EC und vSMC. <sup>66</sup>

Die verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kommen an unterschiedlichen Stellen vor. Der Hauptrezeptor S1P<sub>1</sub> wird ubiquitär gefunden, je nach Organ wird er aber unterschiedlich exprimiert. Im ZNS ist die Expression am stärksten, gefolgt von Lunge und Milz, in der sie ungefähr gleich ist. Etwas niedriger ist sie im Gefäßsystem und am kleinsten in der Niere <sup>65</sup>. Da der S1P<sub>1</sub> Rezeptor endothelstabilisierend wirkt, macht eine starke Expression in der Blut-Hirn-Schranke Sinn. Weitere Funktionen umfassen die Migration und Organisation von Blutzellen, die Angiogenese, eine Bradykardie und die Vasodilatation der großen Arterien über NO-Freisetzung. Diskutiert werden außerdem die Blutdrucksteigerung und eine Vasokonstriktion in kleinen Gefäßen.

Ferner spielt S1P<sub>1</sub> eine große Rolle in der Vaskulogenese und kann ebenfalls durch erhöhte Scherkräfte und ohne physikalische Präsenz von S1P aktiviert werden. Es verhindert ein unkontrolliertes Gefäßwachstum.<sup>95</sup> Interessanterweise kann VEGF zu einer Erhöhung der mRNA Spiegel des S1P<sub>1</sub> führen, obwohl die RNAs der anderen Hauptrezeptoren S1P<sub>2/3</sub> unverändert bleiben.<sup>65</sup> Da VEGF bereits SPHK Spiegel erhöht, scheint eine enge Interaktion zwischen beiden Stoffwechselwegen zu bestehen.

Der S1P<sub>2</sub> Rezeptor ist gewissermaßen der Gegenspieler des S1P<sub>1</sub>. Er inhibiert die Migration, erhöht die Permeabilität und scheint auch eine Wirkung auf Mastzellen zu haben.

S1P<sub>3</sub> ist ein Rezeptor, der die Apoptose verhindert und damit das Zellüberleben verstärkt. Dieser Rezeptor teilt Funktionen des S1P<sub>1</sub> und des S1P<sub>2</sub>. Er fördert wie S1P<sub>1</sub> die Migration von Blutzellen und ruft eine Bradykardie und Vasodilatation hervor, bewirkt aber ähnlich wie S1P<sub>2</sub> eine Steigerung der Permeabilität.

Die hauptsächlich vorkommenden S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> unterscheiden sich neben ihrem Vorkommen und ihrem Aufbau vor allem durch ihre Affinität zum Liganden S1P. Das Maß für die Affinität ist die Dissoziationskonstante  $K_d$ . Eine niedrige Dissoziationskonstante beschreibt eine hohe Affinität und damit eine starke Interaktion. S1P<sub>1</sub> hat mit einem  $K_d$  von 8 nM die höchste Affinität der drei Hauptrezeptoren und wird daher am schnellsten aktiviert. Im Vergleich zum  $K_d$  von S1P<sub>5</sub> (2 nM) handelt es sich aber eher um eine mittelhohe Affinität. Mit jeweils 20-27 nM bzw. 23-26 nM hat S1P eine vergleichsweise niedrige Affinität zu S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>.

Wenn man von niedrigen S1P-Plasmaspiegeln von z.B. 100 nM ausgeht, wie Książek *et al.*<sup>103</sup> sie beschrieben haben, wäre bei einem freien Anteil von 10% der S1P<sub>5</sub> Rezeptor an der Blut-Hirn-Schranke am stärksten aktiviert, der S1P<sub>1</sub> Rezeptor über seinen  $K_m$ -Wert hinaus stimuliert und die S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> nur schwach stimuliert. Es wäre daher mit einer niedrigen Permeabilität zu rechnen. Steigen die Spiegel aber abrupt wie bei einer Infektion oder einer Hämolyse, wäre mit einer Permeabilitätssteigerung, einer Veränderung des Migrationsverhaltens der Blutzellen, einer verstärkten Vasodilatation und einer Unterdrückung der Apoptose zu rechnen. Dieses sensible Gleichgewicht erklärt die kurze Halbwertszeit und engmaschige Regulierung des S1P, seines Fließgleichgewichtes mit SPH und die Möglichkeit, durch externe Stimuli die Rezeptoren zu internalisieren.<sup>111</sup>

Es liegt die Vermutung nahe, dass S1P<sub>2</sub> eine „Überlastungsbremse“ ist. Er verhindert bei hohen S1P Spiegeln die Depletion der Lymphknoten durch übermäßige Migration.

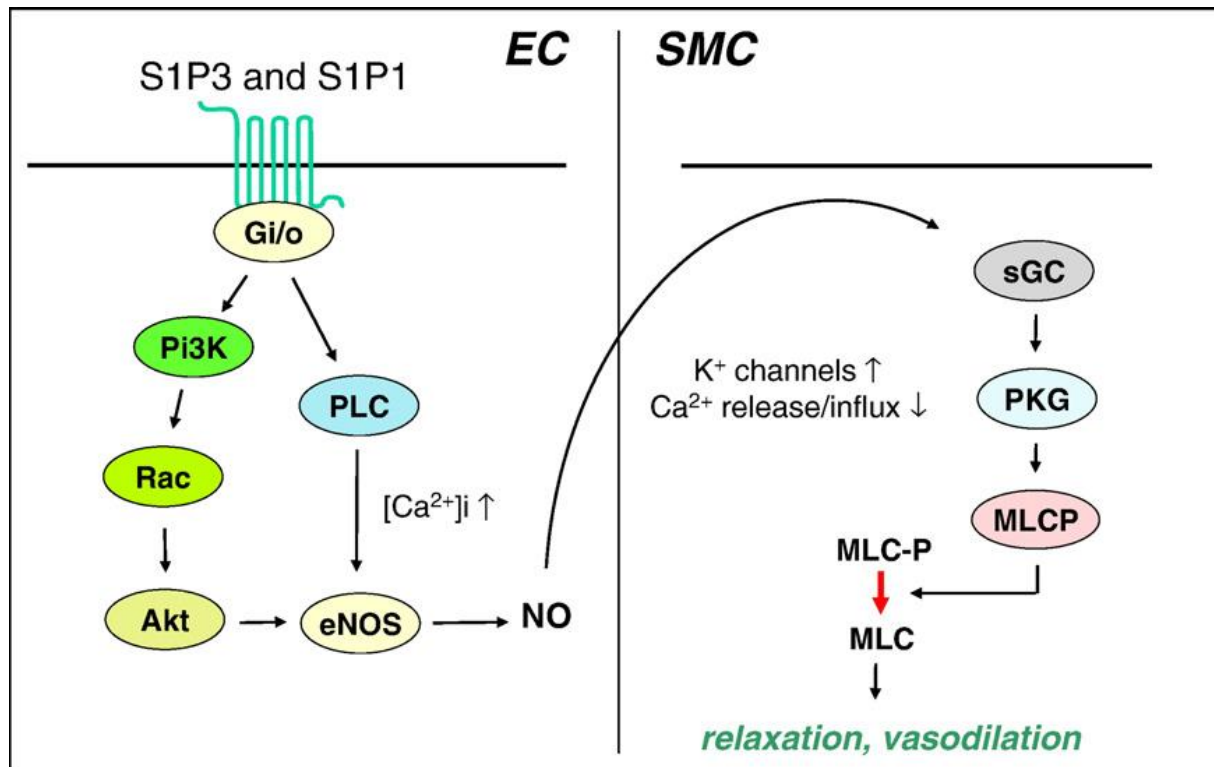


Abbildung 22: Zusammenarbeit des Endothels mit den vSMC nach S1P<sub>1</sub> oder S1P<sub>3</sub> Aktivierung modifiziert nach Brinkmann<sup>56,65</sup>

### 1.9.3. Probleme und Herausforderungen des S1P

S1P ist bei vielen Krankheitsbildern involviert. Es spielt bei schlecht bekannten Stoffwechselwegen eine Rolle. Seine Spiegel sind schwer zu bestimmen und neben den beschriebenen extrazellulären Wirkungen ist es intrazellulär ein „second Messenger“.<sup>145</sup> Beabsichtigt ist trotz dieser Widrigkeiten, die oben genannten Wirkungen des S1P im Rahmen der Sepsis positiv nutzen zu können. Wichtig hierbei sind unter anderem die Wirkungen des S1P auf das kardiovaskuläre System. Als ein Mediator der Chemotaxis lockt es Blutzellen zum Ort des Geschehens an. Es liegt die Vermutung nahe, dass S1P die Rekrutierung von Perizyten an die Gefäßwand erhöhen kann. Damit würde S1P stabilisierend auf die Gefäßpermeabilität wirken. Es antagonisiert die Wirkung von VEGF, einem Zytokin, das neben der Proliferation von neuen Gefäßen eine wichtige Rolle in der Regulierung ihrer Durchlässigkeit spielt.<sup>67</sup>

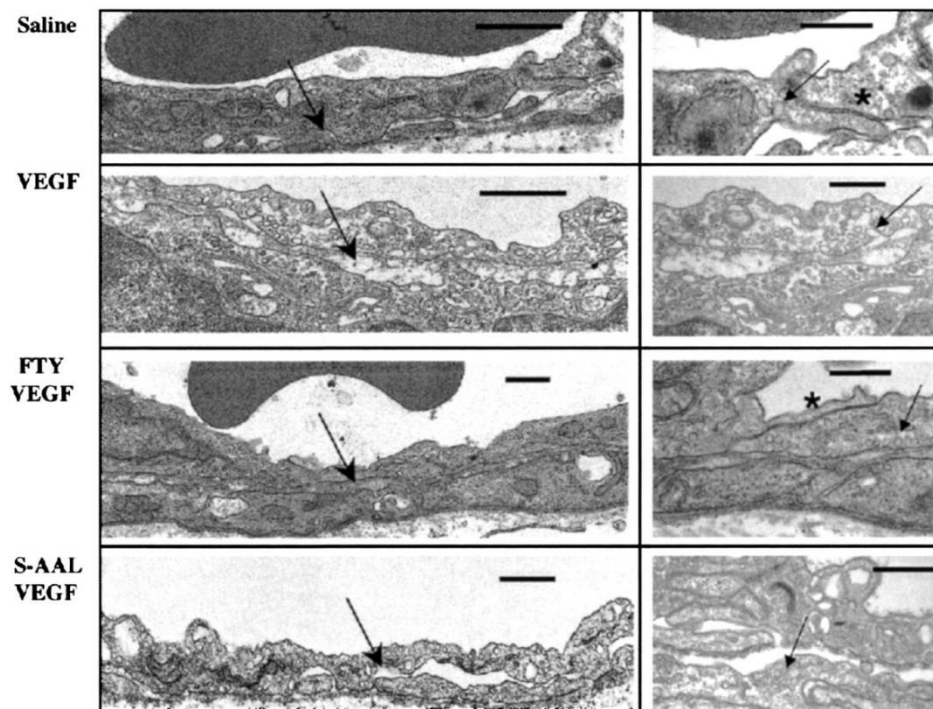


Abbildung 23: S1P als Gegenspieler der Permeabilität nach Sanchez<sup>69</sup>

Die therapeutische Substitution von S1P wirft aber Probleme auf. Die kurze Plasmahalbwertszeit, die mögliche vasokonstriktorische Wirkung auf kleine Gefäße und die bradykardisierende Wirkung machen eine intravenöse Anwendung schwer. Zudem sind andere zum Teil auch extravaskuläre Nebenwirkungen beschrieben worden. Hagen *et al.*<sup>112,113</sup> beschrieben 2010 eine Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen und eine Neurotoxizität. Sugiyama<sup>72</sup> wies eine Neigung zur koronaren Vasokonstriktion und ein Verlust der Herzinotropie nach und beschrieb eine tachykarde Wirkung des S1P.

Aufgrund dieser Nebenwirkungen wurde von dem bekannten Mechanismus der Steigerung der SPHK1 Aktivität bei Sepsis (z.B. durch TNF- $\alpha$ -Produktion)<sup>114</sup> unter SPH-Gabe Gebrauch gemacht und den Mäusen die Vorläufersubstanz SPH intraperitoneal injiziert, um die Anflutungsgeschwindigkeit zu verringern. Da die Produktion und Speicherung von S1P von allem in Blutzellen stattfindet und diese dem Stress einer Sepsis stark ausgesetzt sind, ist von einer Störung des S1P-Stoffwechsels auszugehen. Da die Blutzellen zwar reich an SPHK aber so gut wie keine S1P-Lyase besitzen, ist eine Aktivitätssteigerung der SPHK1 der logische Kompensationsmechanismus dieser Dysfunktion. Die Substitution ihres Substrates SPH, könnte daher zu einer Verbesserung der Stoffwechsellage führen, indem das S1P in den Zielbereich geführt wird.

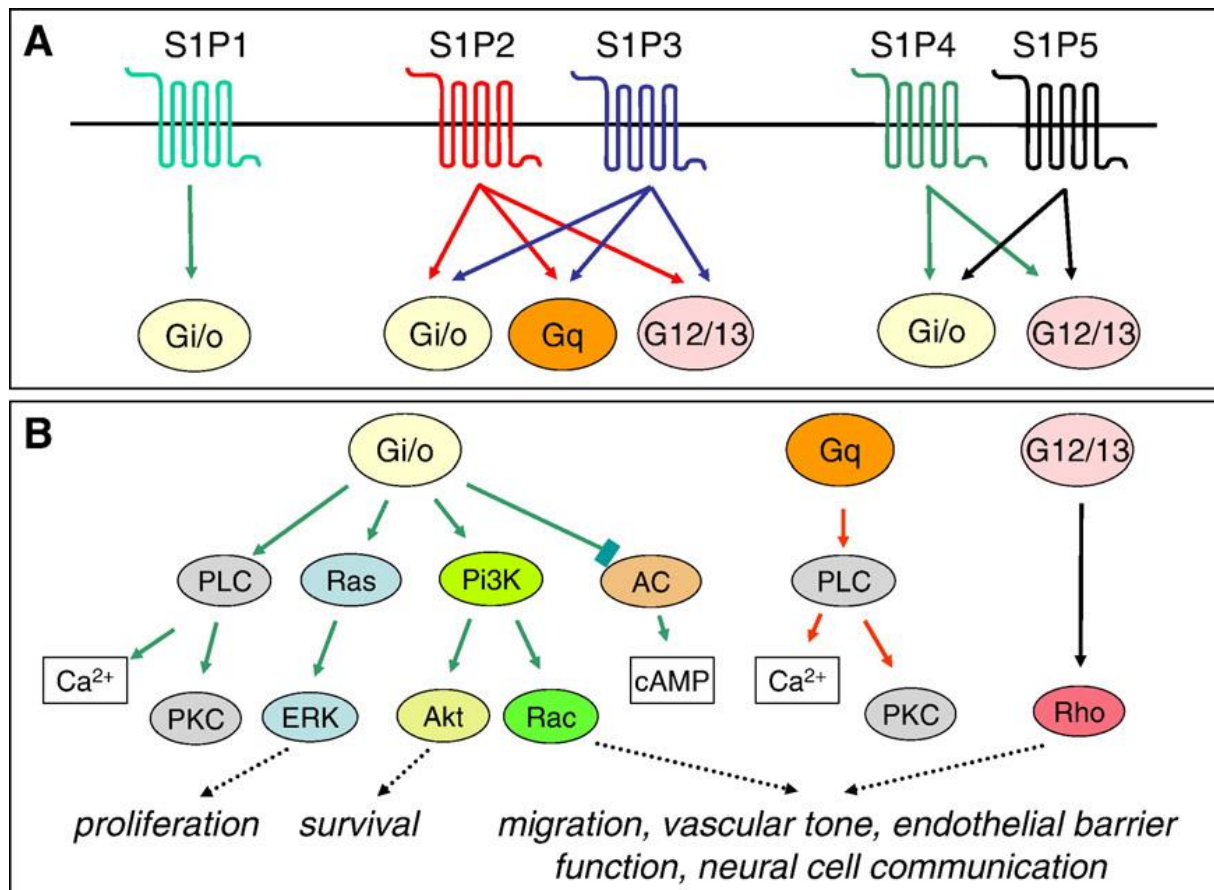


Abbildung 24: Übersicht der involvierten G-Proteine des S1P- Stoffwechsel modifiziert nach Brinkmann, V.<sup>65</sup>

#### 1.9.4. Synthetische S1P Analoga

Es existieren zusätzlich noch synthetische Sphingosinanaloga, die selektiv an bestimmten Rezeptoren antagonistisch wirken. Beispielsweise ist das Fingolimod (FTY720) in seiner aktiven phosphorylierten Form FTY720-P in der Lage mit hoher Affinität bei einem  $K_m$  von 0,3 nM an S1P<sub>1</sub> zu binden und anschließend zu einer Internalisierung des Rezeptors zu führen. Aufgrund der schlechten Affinität zu S1P<sub>2</sub> verhindert FTY720 damit die Lymphozytenrezirkulation und wirkt antientzündlich. Es wird bisher in der Therapie der Multiplen Sklerose verwendet.

Tabelle 8: Affinitäten des FTY 720-P nach Brinkmann <sup>65</sup>

Rezeptor-Subtyp	Affinität
S1P <sub>1</sub>	0,3 nM
S1P <sub>2</sub>	>10.000 nM
S1P <sub>3</sub>	3,1 nM
S1P <sub>4</sub>	0,6 nM
S1P <sub>5</sub>	0,3 nM

Weitere Substanzen sind AUY945, SEW 2871, KPR 201, VPC24191 und VPC23019. In dieser Arbeit wird aufgrund ihrer mangelnden Relevanz nicht näher auf sie eingegangen.

## **1.10. Fragestellung**

Nach unseren erfolgreichen Vorarbeiten (siehe 1.7.) und aufgrund der bisherigen Befunde zu S1P/SPH ist in dieser Arbeit die Hypothese untersucht worden, daß SPH und S1P die mikrovaskuläre Destabilisierung und folglich Hyperpermeabilität und Hypotonie antagonisieren kann und das Outcome günstig beeinflussen kann.

## **2. Versuchsaufbau, Material und Methoden**

### **2.1. Mäuse**

C57/B6 Mäuse sind die am weitesten verbreiteten Mäuse und stellen bei Mäuseversuchen den Goldstandard der meisten Forschungsgebiete dar. Ihr Genom wurde bereits 2002 vollständig sequenziert.<sup>70</sup> Für diese Versuchsreihe wurden allerdings vor allem Mäuse mit einem Gewicht zwischen 18 und 25 Gramm verwendet, sodass bei ähnlicher Größe auch ein ähnlicher Konstitutionstyp vorlag. Alle Testmäuse waren männlich. Die für die Versuche notwendige genetische Ähnlichkeit war damit gegeben. Im Ruhezustand liegt die durchschnittliche Herzfrequenz in der Regel zwischen 300 und 450 Schlägen pro Minute und der Blutdruck ist vergleichbar mit dem des Menschen.

Alle für den Versuch verwendeten Mäuse mussten zu Beginn des Versuches gesund sein. Es wurde dazu ihr Gangbild und Verhalten (siehe 2.2.) als Anhaltspunkt verwendet. Kranke Mäuse wurden nicht zum Versuch zugelassen. Zur Unterscheidung der Mäuse sind vor allem zwei Markierungsverfahren verwendet worden. Zum einen wurden die Ohren der Mäuse gelöchert, oder der Schwanz wurde mit schwarzem Filsstift entweder an der Wurzel, an der Spitze oder in der Mitte markiert. Da die Tiere sofort nach Versuchsbeginn getrennt werden und einzeln im Käfig verbleiben, ist die Markierung der Tiere nur eine weitere Sicherheitsmaßnahme. Im Tierstall teilten sich maximal vier Tiere einen Käfig. Die Isolierung der unter Beobachtung stehenden Tiere sollte Verfälschungen der Ergebnisse durch Verletzung der Mäuse untereinander vorbeugen, vor allem, weil sich innerhalb einer Sepsisgruppe schwerer betroffene Mäuse eventuell nicht gegen weniger Betroffene wehren können. Es wurden außerdem noch weitere Vorkehrungen getroffen, um die Mäuse besser zu betreuen. Das Futter, das normalerweise im Deckgitter des Käfigs liegt und damit eine physische Unversehrtheit der Mäuse voraussetzt, damit letztere sich autonom ernähren können, wurde in eine Schale innerhalb des Käfigs gestellt, damit auch septische Mäuse weiterhin essen können.

### **2.2. Versuchsbeschreibung und Sepsis-Severity-Score**

Am Modellorganismus männlicher C57/Bl6 Mäuse, die in der Regel zwischen 18 und 25 Gramm wiegen, wird eine auf das Körpergewicht adaptierte Dosis von Lipopolysacchariden (im folgenden LPS) appliziert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h beginnt der Versuch mit einer Injektion von 20 mg/kgKG LPS. Dies entspricht meist einer Dosis zwischen 360 und 440  $\mu$ g. Lipopolysaccharide sind hochkonservierte Antigene, die auf der Membran von gramnegativen Bakterien zu finden sind. Sie lösen einen fulminanten Endotoxinämieschock aus, der mit einer septischen Reaktion gleichgesetzt werden kann. Es bindet an das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP).

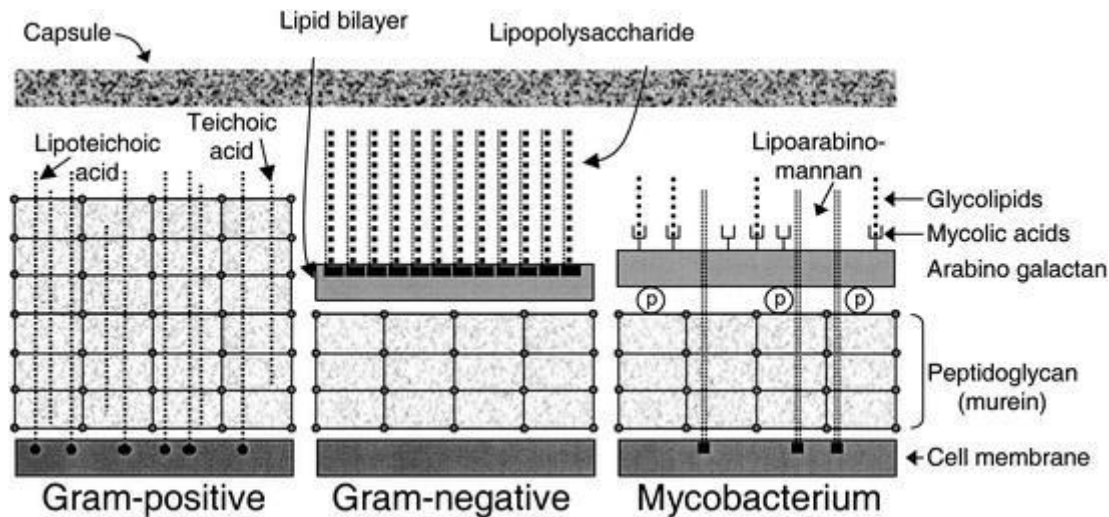


Abbildung 25: LPS nach Amersfort *et al.*<sup>144</sup>

Das Lipoprotein bindende Protein präsentiert das Lipopolysaccharid als Antigen in niedrigen Dosen dem CD14 und TL4 (Toll-Like) Rezeptoren<sup>145</sup>, leitet so die Inflamationsreaktion ein und verhindert bei hohen LPS Konzentrationen eine überschießende Immunantwort.<sup>118</sup> Die Dosis von 20 mg/kgKG entspricht einer Menge, die ein wenig unter der sogenannten letalen Dosis 50 (LD50) liegt. Die LD50 beschreibt die Menge einer Substanz, eines Wirkstoffes oder eines Giftes, die ausreicht um 50% der Versuchsorganismen oder Versuchstiere in einem festgelegten Zeitrahmen zu töten. Bei der Maus liegt diese Dosis bei ungefähr 24 mg/kgKG. Es wäre also zu erwarten, dass etwas weniger als die Hälfte der Versuchstiere ohne das von uns etablierte Scoringssystem den Versuch überleben. Da Sepsisversuche allerdings sehr belastend sind, werden zu bestimmten Zeitpunkten (0, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h) mehrere Surrogatparameter erhoben, die die Schwere der Belastung der Maus durch die Blutvergiftung abschätzen sollen. Beobachtet wurden hierbei die Änderung des Verhaltens, das heißt die Geschwindigkeit, Art und Weise, mit denen sich die Maus durch den Käfig bewegt, die Schmerzen, die die Maus vor allem durch Zittern zeigt und das Vorhandensein eines hämodynamisch wirksamen Aszites an zwei Versuchsgruppen von jeweils 15 Mäusen. Zusätzlich wurden zum einen der Gewichtsverlust in Prozent des Ausgangsgewichts und Veränderungen der Atemfrequenz, sogenannte Dyspnoe (Atemnot) gemessen. Jedem dieser Parameter wird je nach Schwere der Ausprägung ein Wert zwischen 0 und 20 zugeordnet. In dieser Versuchsreihe waren vor allem der Gewichtsverlust und das Verhalten ausschlaggebend, weil Aszites, Dyspnoe und Schmerz die Ergebnisse meist nicht stark beeinflussen. Die Summe dieser Zahlen ergibt dann den Score der Maus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Überschreitet dieser Score die von der Oberbayerischen Regierung festgelegte Obergrenze von 20 Gesamtpunkten, muss der Versuch durch Tötung der Maus beendet werden. Das Beenden der Maus findet meist durch einen Genickbruch statt.



**Tabelle 9: Sepsis-severity Score**

Punkte	0	5	10	20
Verhalten / Beeinträchtigung	Normal	leicht	Moderat bis schwer	Komatös
Gewichtsverlust	0 – 5%	5 – 10%	10 – 15%	> 15%
Schmerz	Kein	gering	mittel	Stark
Aszites	Kein	gering	mittel	Stark
Dyspnoe	Kein	gering	mittel	Stark

Der Gewichtsverlust wird anhand des Ausgangsgewichtes der Maus berechnet. Zu jedem der oben genannten Zeitpunkte wird das Gewicht der überlebenden Mäuse gemessen und der Gewichtsverlust wird sofort berechnet, um zu lange Leidensperioden zu verhindern. Ist der Gewichtsverlust zwischen 0 und 4,99% oder hat die Maus im Vergleich zum Ausgangsgewicht (Gewicht zum Zeitpunkt 0 h) an Gewicht zugenommen, wird die Kategorie „Gewichtsverlust“ mit 0 Punkten evaluiert. Beziffert sich der Verlust zwischen 5% und 9,99% sind es 5 Punkte, bei einem berechneten Wert von 10% bis 14,99% sind es 10 Punkte und ab 15% muss die Maus mit 20 Punkten bewertet und damit beendet werden. Die Gewichtsschwankungen gesunder Sham-Mäuse blieben stets unter 0,5%.

Das Verhalten stellt eine subjektivere Zustandsgröße in dieser Versuchsreihe dar. Es wird beobachtet, wie sich Geschwindigkeit, Lebhaftigkeit, Gangbild, Putzverhalten, Interesse, Fluchtreflex und Bewusstsein der Maus verändern. Falls kein Unterschied zu einer nicht septischen Maus festzustellen ist, wird dies mit dem Teilscore „0“ ausgedrückt. Ansonsten beziffert sich der Score auf entweder 5 für leichte Veränderungen des Gangbildes, 10 Punkte für deutlich langsamere Motilität und Einschränkungen des Putzverhaltens und maximal 20 Punkten bei einem komatösen Zustand. Hierbei lässt sich die Maus in Rückenlage legen, ohne dass sie es aus eigener Kraft schafft, wieder in die für sie angenehmere und physiologische Bauchlage zurückzukehren.

Für die Messung des Aszites wird die Maus wie bei einer Injektion gegriffen und es wird versucht, mit dem Zeigefinger danach zu tasten. Meist fällt dieser Versuch negativ aus. Auch die Dyspnoe blieb in der Regel subklinisch. Dies erklärt sich (wie der meist nicht vorhandene Schmerz) dadurch, dass die Tiere während des Versuches den partiellen Opioidrezeptoragonisten Burpenorphin (Temgesic®) intraperitoneal erhielten.

Die Mäuse werden in zwei verschiedene Gruppen aufgeteilt. Eine erhält PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung/Phosphate Buffered Saline) als Kontrolle, die andere das Sphingolipid D-Sphingosin. Für unsere Versuche wurden 5 mg/kgKG SPH gegeben. Das sind  $1,66 \times 10^{-5}$  mol/kgKG. Bei vollständiger und sofortiger Aufnahme ins Blut und Umwandlung in S1P, entspräche dies (wenn 8% der Mausmasse Blut sind) einer 500 mikromolaren S1P Konzentration und damit dem tausendfachen der normalen Plasmakonzentration. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Damit flutet der gesamte Wirkstoff nicht sofort an.

## 2.3. Methoden in vivo

### 2.3.1. Nicht invasive Blutdruckmessung: Das Coda Blutdrucksystem

Vor Versuchsbeginn werden neben dem Gewicht auch ein Herzultraschall (Echokardiographie/Sonographie) und eine nicht invasive Blutdruckmessung durchgeführt. Die Blutdruckmessung findet am Schwanz der Maus statt. Dazu werden die Mäuse auf eine Wärmeplatte gelegt und es werden ihnen zunächst ein sogenannter „Occlusion Cuff“ (O-cuff) auf Höhe der Schwanzwurzel und ein Volume-Pressure-Recording Cuff (VPR-Cuff) distal davon angelegt. Der proximale O-Cuff baut einen zunächst blutflussunterbindenden Druck von bis zu 250 mmHg auf, der VPR Cuff misst dabei den Blutfluss distal der Okklusion. Durch sequentielle Senkung des O-Cuff Drucks nimmt der Blutfluss zu und das Programm ermittelt daraus Werte wie den systolischen und diastolischen Blutdruck. So kann der Grad der Hypotension in der Sepsis sehr genau bestimmt werden, sofern er über 40 mmHg liegt. Die Blutdruckmessung erfolgt mit dem Coda System. Eine Annäherung an die Funktionsweise gibt folgender Artikel wieder.<sup>119</sup> Das modifizierte Protokoll befindet sich im Anhang.

Ziel der ersten nicht invasiven Blutdruckmessung zu Beginn ist die Etablierung von Blutdruckwerten, die als Ausgangswerte („Baseline“) fungieren sollen. Eine weitreichende Komplikation des septischen Schocks ist eine therapierefraktäre Hypotonie. Es kann also der Blutdruckabfall der Versuchstiere quantifiziert werden. Am meisten beachtet wird dabei der mittlere arterielle Blutdruck (MAP). Dieser errechnet sich anhand des systolischen und des diastolischen Blutdruckwertes. Er wird anhand der Summe von einem Drittel des systolischen und zwei Drittel des diastolischen Blutdruckes errechnet.

Die Formel lautet wie folgt:  $MAP = \frac{Psyst + 2 \cdot Pdiast}{3}$

Das US-amerikanische National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) definiert Hypotension als Blutdruckwerte unter 90/60 mmHg.<sup>129</sup> Das entspricht einem mittleren arteriellen Blutdruck von 70 mmHg. Es muss also spätestens ab diesem Wert von einer Hypotension ausgegangen werden.

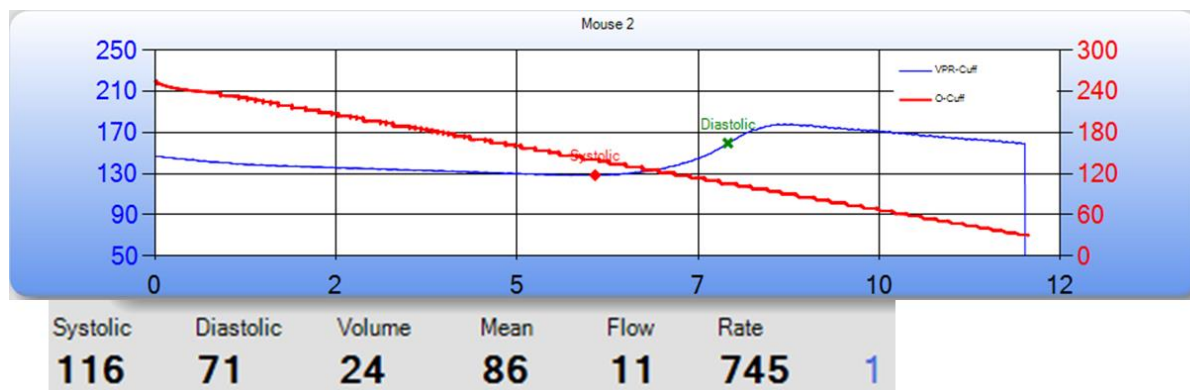


Abbildung 26: Beispiel einer nicht invasiven Blutdruckmessung anhand des Coda Systems

Der Blutdruck wurde zu Beginn und nach 12 h, 24 h, 36 h und am Versuchsende, nach 120 Stunden, gemessen.

## 2.3.2. Zwei-Photonen Mikroskopie

### 2.3.2.1. Zielsetzung der Mikroskopie und Injektionsnarkose der Mäuse

Bei der Zwei-Photonen Mikroskopie werden die Mäuse narkotisiert und anschließend mit dem Ohr auf dem Objektträger gelegt, sodass die Permeabilität der Ohrgefäße begutachtet werden kann.

Die Narkose (MMF) besteht aus dem Benzodiazepin Midazolam, dem  $\alpha 2$ - Rezeptoragonisten Medetomidin und dem Opioid Fentanyl. Es wird kein Muskelrelaxanz verwendet und die Mäuse müssen, obwohl sie tief schlafen, nicht intubiert werden. Die Antagonisierung der Narkose (ANF) erfolgt mit dem Benzodiazepinantagonisten Flumazenil, dem Opioidantagonisten Naloxon und dem  $\alpha 2$ - Adrenorezeptorantagonisten Atipamezol. Den narkotisierten Mäusen wird anschließend eine Nadel in die Schwanzvene gelegt, um ihnen über diese Kanüle TRITC-Dextrane zu applizieren. Die Extravasation des roten Farbstoffes kann dadurch sichtbar gemacht und durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert werden. Eine hohe Permeabilität spricht für eine fortgeschrittene vaskuläre Dysfunktion.

### 2.3.2.2. Vereinfachtes Funktionsprinzip der 2-Photonen Mikroskopie

Die 2-Photonen Mikroskopie beruht genau so wie die Fluoreszenzmikroskopie auf der Erregung von Molekülen, die Fluorophore genannt werden. Die graphische Darstellung der Absorptions- und Emissionskurven dieser Fluorophore entspricht in etwa einer Gauß'schen Normalverteilung. Die Maxima dieser Kurven werden jeweils Absorptions- und Emissionsmaxima genannt. Der Unterschied zwischen 2-Photonen und konventioneller Fluoreszenzmikroskopie besteht unter anderem darin, dass letztere nach dem Prinzip der Stokesverschiebung funktioniert. Kurzwellige höher energetische Strahlung wird dabei absorbiert und langwelligere energieärmere Strahlung emittiert.

Diese Spektrumsverschiebung funktioniert durch den Quantensprung eines Elektrons. Dies setzt eine Anwendung im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums voraus (300-750/800nm). Bei der 2-Photonen Mikroskopie wird höherwellige zum Teil nicht sichtbare Strahlung (z.B. 860nm) verwendet. Indem zwei dieser niederenergetischen Photonen beinahe zeitgleich den Farbstoff erregen, kommt dies einer Erregung mit der Hälfte der Wellenlänge (hier 430nm) gleich. Man nennt diese Aufnahmetechnik „Second Harmonic Generation“ (SHG) Microscopy. Aufgrund des minimalen Zeitunterschiedes findet aber keine Stokesverschiebung statt. Die 2-Photonenmikroskopie benötigt einen potenten Laser, damit das Gewebe adäquat erregt werden kann. Sie hat aber die Vorteile, dass zum einen aufgrund der längeren Wellenlänge eine größere Eindringtiefe möglich ist und durch die sehr fokussierte Erregung sensibles Gewebe geschont wird. Die 2-Photonen Mikroskopie ermöglicht so die fokussierte dreidimensionale Darstellung von Blutgefäßen in vivo.<sup>120</sup>

### 2.3.2.3. Anwendung im Rahmen des Mausmodells

Um ein dreidimensionales Bild zu erhalten, wurde am Mäuseohr eine Fläche von 0,04 mm<sup>2</sup> (200 µm x 200 µm) in 10 parallelen Ebenen mit jeweils 4 µm Abstand mit einem geeigneten Filter fotografiert. Um eine langfristige Begutachtung dieses Areals durchführen zu können, wurde nach TRITC-Dextrangabe der Abschnitt 10 Minuten lang alle 15 Sekunden aufgenommen. So entstanden 40 Bilder, die Stück für Stück das Extravasationsverhalten des Farbstoffes in verschiedenen Mäusegruppen dokumentieren. Die Fluoreszenz ist dabei ein Indikator für die Gefäßpermeabilität<sup>121</sup>.

Da diese Messung mit einem neueren Laser durchgeführt wurden als die Referenzmessungen,<sup>53</sup> ist von einem systemischen Fehler in der Datenakquisition auszugehen. Um die Ergebnisse dennoch vergleichen zu können, wurde die Kontrollkurve dieser Experimentenreihe mit einer mathematischen Regressionsanalyse an die Kontrollkurve aus dem oben genannten Paper angepasst und mit der erhaltenen Funktion der Fehler in der Gruppe der behandelten Mäuse berichtigt (siehe Kapitel 4).

Aufgrund des mit ihr verbundenen Aufwandes wurde die 2-Photonen Mikroskopie nur einmal 12 Stunden nach Versuchsbeginn an den Mäusen durchgeführt.

### 2.3.3. Echokardiographie

#### 2.3.3.1. Gasnarkose der Mäuse

Vor der Echokardiographie werden die Mäuse in einer kleinen Kammer durch eine Gasnarkose schläfrig gemacht. Die Gasnarkose wird anschließend auf der Sonographieplatte für die Dauer der Untersuchung aufrechterhalten. Für dieses Verfahren kommen verschiedene Narkosegase wie Sevofluran oder Isofluran in Frage. Aufgrund seines niedrigen Blut-Gas Verteilungskoeffizienten von ungefähr 0,65 flutet Sevofluran schnell an und aus und eignet sich daher für das kurze Sonographieverfahren. Außerdem ist es nicht schleimhautreizend und hat nachgewiesener Weise eine niedrigere kardiodepressive Wirkung als Isofluran. Sevofluran gilt als kardioprotektive Substanz und findet Einsatz in der Herzchirurgie<sup>122</sup> oder bei kardiovaskulären Risikopatienten. Da hier kein Rückatmungssystem oder Kalk verwendet wird, ist keine Compound A Bildung zu erwarten. Isofluran hat mit 1,45 einen höheren Blut-Gas Koeffizienten und flutet damit langsamer an und aus. Es wird geringer als das Isofluran metabolisiert. Es hat eine vasodilatatorische Wirkung und bewirkt eine kompensatorische Tachykardie. Es dient daher als Stresstest, da es die kardiale Reserve der Mäuse offenbart. Während die Blutdruckmessung die Herz-Kreislaufleistung in Ruhe beschreibt, ist die Sonographie unter Isofluran ein Maß für die kardiale Reserve bei Erhöhung der Belastung. Deswegen wurde zur Narkose ein 1,5% Isofluran/Luftgemisch verwendet.

### 2.3.3.2. Durchführung der Echokardiographie

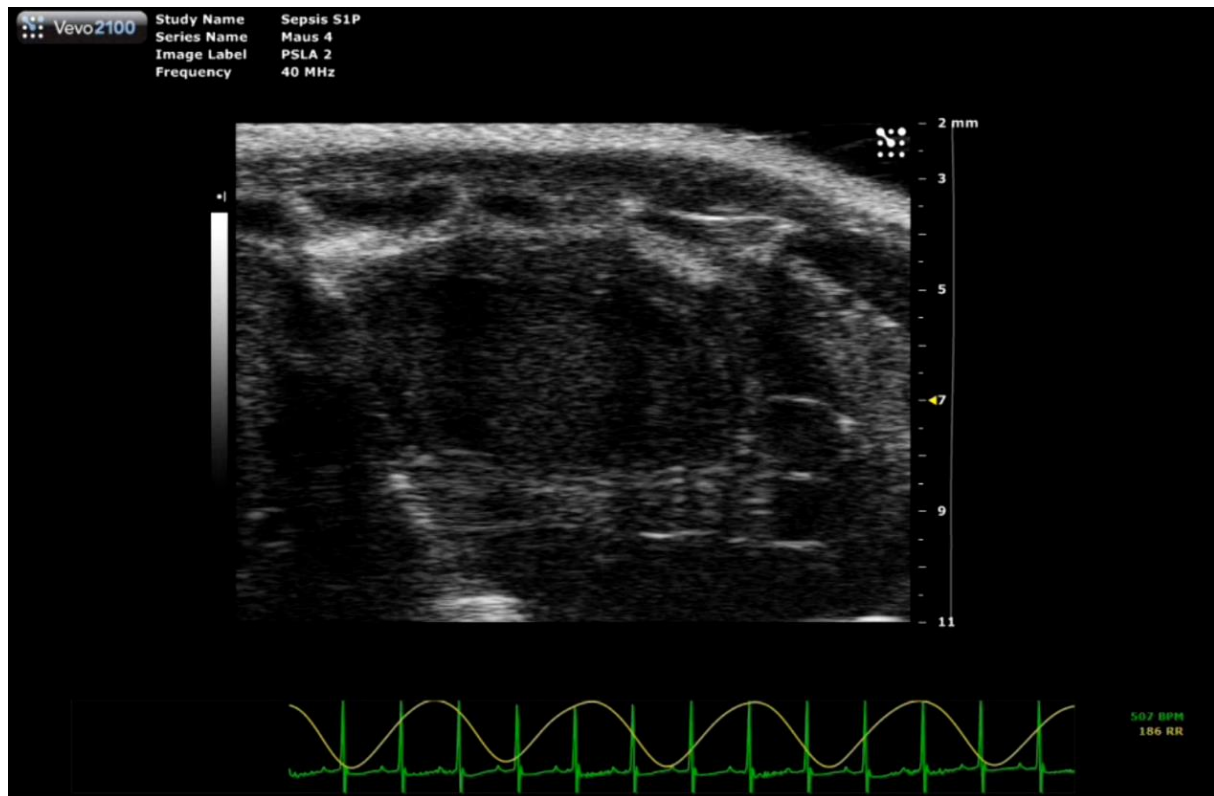


Abbildung 27: Echokardiographie des linken Ventrikels in der parasternalen Längsachse

Bei der Echokardiographie werden zwei Aufnahmen (Videos) im sogenannten B-Mode und eine im sogenannten M-Mode aufgenommen. Anders als in der konventionellen Echokardiographie wird hier im B-Mode eine linksventrikuläre Bildaufnahme angefertigt. Der Fokus liegt dabei auf der linksventrikulären Pumpfunktion. In der Systole und der Diastole werden anschließend Ventrikelgröße und Form am Gerät skizziert. Dieser errechnet dann Parameter, die die Herzfunktion beschreiben. Diese sind unter anderem die Ejektionsfraktion,  $EF = \frac{(EDV - ESV)}{EDV}$

$$\text{und das „Fractional Shortening“ } FS = \frac{(EDD - ESD)}{EDD}$$

Dabei sind:

EDV das enddiastolische Volumen

ESV das endsystolische Volumen

EDD die enddiastolische Ventrikeldimension

ESD die endsystolische Dimension

Weitere Parameter sind das Schlagvolumen sowie das Volumen, das geschätzte Gewicht des Ventrikels und die Oberfläche des Ventrikels. Hier wird nicht weiter auf sie eingegangen. Aus dem Schlagvolumen und der nebenbei gemessenen Herzfrequenz lässt sich das Herzzeitvolumen berechnen. Darüber hinaus ermöglicht das Gerät ein Elektrokardiogramm und eine Temperaturmessung. Nachdem die Aufnahmen im B-Mode der Herzachse durchgeführt worden sind, werden Aufnahmen im M-Mode angefertigt.


Der M-Mode ergibt sich durch eine Drehung des Schallkopfes um 90° entgegen des Uhrzeigersinns nach dem B-Mode. Auf ihm lassen sich die Exkursionen des Myokards aufzeichnen und bewerten.

Auch hier ist eine Messung der Kontraktilität des Herzens möglich. Die Werte des M-Modes ermöglichen eine Ergänzung der B-Mode Daten.


Diese Methoden werden jeweils vor und nach 12 Stunden nach der Sepsisinduktion durchgeführt. Dadurch wird eine initiale Begutachtung des kardiovaskulären Systems durchgeführt, die als Ausgangs- bzw. Vergleichswerte für eventuelle spätere Veränderungen in der Sepsis verwendet werden.

Die folgende Graphik verdeutlicht die Reihenfolge der Versuche in vivo.

**LPS Injektion**



Ende des Tierversuches  
Organentnahme, Immunhistologie, ELISA



Zeit (h)	-12h	0h	12h	24h	36h	48h	72h	120h
SPH Gabe/ PBS Gabe	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Scoring	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Blutdruck	x	✓	✓	✓	✓	x	x	✓
Echokardio- graphie	✓	x	✓	x	x	x	x	x
2-Photonen- Mikroskopie	x	x	✓	x	x	x	x	x

Abbildung 28: Übersicht des Versuchsaufbaus

## 2.4. Methoden ex vivo

### 2.4.1. Organentnahme und Aufbereitung

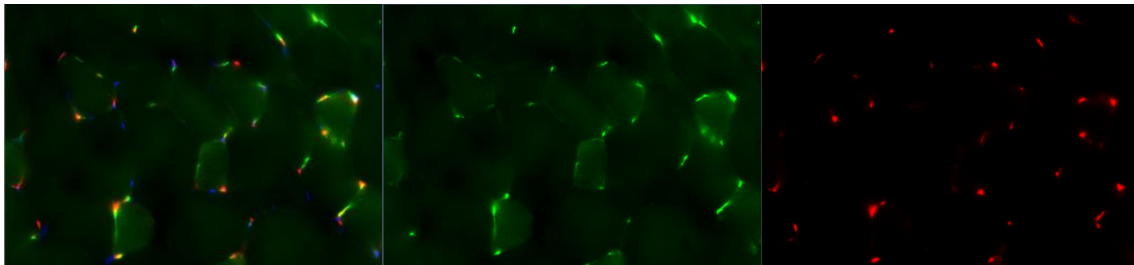
Alle Mäuse, die einen Gesamtscore von 20 Punkten erreichen, werden beendet. Um mehr Informationen über die inneren Organe der Maus zu erhalten, werden der Maus Blutserum, Herz, Leber, Milz, Nieren, und ein Stück peripheren Muskel (meist der M. quadriceps femoris auf beiden Seiten) entnommen. Herz, Leber und Milz werden halbiert und während die eine Hälfte für molekularbiologische Analysen verwendet wird, wird die andere in einen Immersionsstoff mit dem Namen „Tissue Tek®“ getaucht. Der Immersionsstoff, der bei Raumtemperatur flüssig ist, wird bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt fest und ermöglicht es, das betroffene Organ aufzubereiten (nach Lagerung

bei -80°C oder in Trockeneis). Das Organ wird geschnitten auf einen Objektträger aufgetragen, fixiert, mit Antikörpern gefärbt (siehe Anhang) und anschließend mikroskopiert. Zum Schneiden wird ein Kryotom verwendet, das in der Lage ist, aus dem „Organblock“ 5 µm dicke Schnitte herzustellen. Diese werden nach dem Färbeprotokoll zuerst aufgetaut, dann in Aceton fixiert. Nachdem anschließend mit einem Fettstift (Dako Pen®) die Ränder aller drei sich auf dem Objektträger befindenden Schnitte abgegrenzt wurden, wird das Organ für eine halbe Stunde mit 30 Mikrolitern Blocking Solution (Triton+BSA) inkubiert. Anschließend wird die erste Struktur, die sichtbar gemacht werden soll, mit einem Antikörper gegen CD<sub>31</sub> aus der Ratte anvisiert. Nach Inkubation mit einem geeigneten rot fluoreszierenden Sekundärantikörper werden die Kapillaren rot sichtbar. Nach einem Waschschrift, wird dieser Prozess mit zwei anderen Antikörpern wiederholt. Es handelt sich dabei um einen Antikörper gegen das Protein NG<sub>2</sub> aus dem Hasen, gefolgt von einem anderen Antikörper aus der Ziege, der grün fluoresziert. NG<sub>2</sub> ist ein Protein, das charakteristisch für Perizyten ist. Das detaillierte Protokoll befindet sich im Anhang.

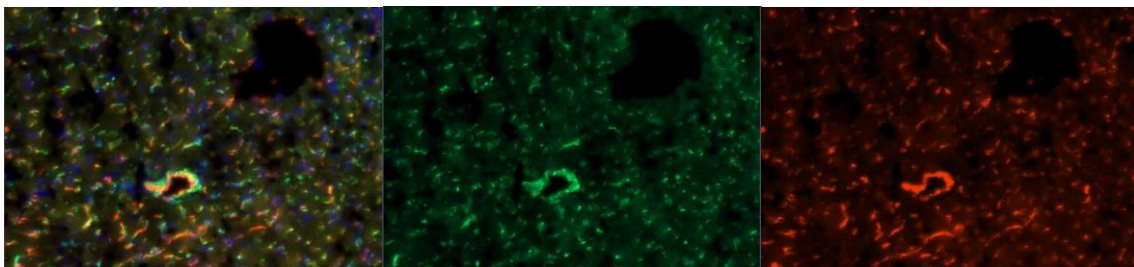
Schließlich werden die Schnitte mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole für die blaue Kernfärbung) als Mounting Agent gedeckelt und am konfokalen Mikroskop angeschaut.

### 2.4.2. Mikroskopieren der Schnitte

Beim Mikroskopieren wird die Anzahl an roten (Endothelzellen als Maß der Kapillarisation) und grünen (Perizyten) Signalen pro Gesichtsfeld (auch High power Field oder HPF genannt) gezählt. Ein HPF ist eine quadratische Sichtfläche mit einer Fläche von etwa 0,05mm<sup>2</sup>. Dabei wird davon ausgegangen, dass die mikroskopierten Organe ein homogenes Schnittbild aufweisen.



*peripherer Muskel*



*Herzmuskel*

**Abbildung 29: Immunfärbung des Muskels und des Herzens. Es werden spezifisch Perizyten und Endothelzellen gefärbt.**

Um von einem homogenen Schnittbild ausgehen zu können, wird das Herz quer in einer Ebene geschnitten, die einen Blick auf beide Ventrikel ermöglicht. Außerdem werden von jedem Herz 6-10 Schnitte gemacht, die alle mikroskopiert werden. Der dadurch entstehende Mittelwert reduziert die dabei entstehenden Ungenauigkeiten. Dadurch dass das Mäuseherz klein ist, passt es mit seinem



Querdurchmesser vollständig auf den Objektträger. Hiermit lassen sich lokal auftretende Schnitte oder ischämisch assoziierte Artefakte leichter herausrechnen.

Vergleiche vor und nach der LPS Applikation ermöglichen eine Beschreibung der vaskulären Dysfunktion in Abhängigkeit von der Zeit.

In diesem Sinne haben wir die Perizytenzahlen der Mäuse in Herz und Muskel alle 12 Stunden gemessen, um einen Überblick über den durch LPS entstehenden Schaden und die Regeneration dieser Strukturen zu bekommen.

Die komplementär entwickelte Färbung für glatte Muskulatur ist vollständigshalber auch im Anhang aufgeführt. Im Folgenden ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen.

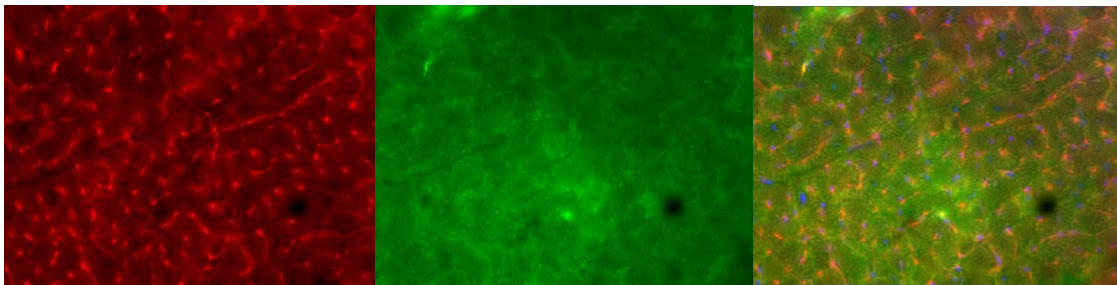


Abbildung 30: Übersichtsaufnahme: Färbung von VSMC und Endothelzellen

### 2.4.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 2.4.3.1. Die Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction

Da es sich um sehr gut durchblutete Organe handelt, wurden die Niere und das herauspräparierte basale Herzstück zu molekularbiologischen Zwecken auf Trockeneis abgenommen und die RNA per „Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction“ für verschiedene für die Permeabilität wichtige Proteine isoliert.

Dazu wird das zu untersuchende Organ in saurer Umgebung mit 1 mL Trizol®, einer Mischung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat zusammen zerkleinert. Während das Guanidiniumthiocyanat Proteine und RNAsen denaturiert und damit die RNA von ihrer Bindung mit ribosomalen Proteinen befreit, bindet das Phenol vor allem denaturierte Proteine und Lipide. Die zusätzlich zugefügten 200 µL Chloroform trennen das organische Gemisch nach Ultrazentrifugation (für 15 min bei 4°C bei 12000 g, dabei ist g die Erdbeschleunigung von  $9,81 \text{ m.s}^{-1}$ ) in drei Phasen. Eine dünne aqueose RNA-haltige Schicht sitzt einer klaren bis milchtrüben DNA haltigen Phase auf. Ganz unten befindet sich das Phenol mit den Proteinen und den Lipiden. Der Überstand wird in einem neuen Eppendorfgefäß mit einer Menge Isopropanol gemischt, die 80% des Überstandsvolumen entspricht. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und einem Ausfällungszentrifugationsschritt (4°C 10 min 12000-g), wird der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 1mL 75% Ethanol gewaschen, um Unreinheiten zu beseitigen. Das sehr RNase sensible Pellet wird anschließend getrocknet und in Diethylpyrocarbonat (DEPC) gelöst. DEPC hat den Vorteil RNAsen kovalent zu binden und so zu deaktivieren. Die Photometrie ermöglicht eine quantitative Bestimmung der RNA und die Gelelektrophorese gibt Aufschluss über ihre Qualität. Bei der Gelelektrophorese erscheint die isolierte RNA in drei Banden (5S, 18S und 28S RNA). Die 5S-RNA Bande kann schwächer ausgeprägt sein. Beim Auftreten



von mehr Banden muss von einem unsauberen Arbeiten ausgegangen werden, der zu einem Abbau der Nucleinsäurekette geführt hat.

#### *2.4.3.2. Quantitative PCR*

Nach der Extraktion wird die Bande durch reverse Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben. Es entsteht ein DNA-RNA Doppelstrang. Die RNA kann enzymatisch durch die H-RNase aufgespalten werden und es wird ein komplementärer DNA Strang anhand von residualen RNA-Primern synthetisiert. Es entsteht so ein DNA Doppelstrang, der durch PCR vervielfältigt werden kann. Dadurch kann auch die sich in der Probe befindende Menge an cDNA für ein bestimmtes Zielprotein genau ermittelt werden. Der Vorteil einer cDNA besteht darin, dass sie keine Introns besitzt und damit klar einem Protein zuzuordnen ist. Die genaue Zuordnung eines Proteins, zu dessen erhöhter cDNA ermöglicht die Identifizierung eines potentiellen Angriffspunktes für Therapeutika bei der Sepsis.

Im Unterschied zur normalen PCR, bei der in 3 Schritten der DNA Gehalt einer Probe verdoppelt wird, wird bei der quantitativen PCR (qPCR) eine Farbsonde verwendet, dessen Fluoreszenz die Menge an DNA wiedergibt, die sich in der Probe befindet. Die Sonde ermöglicht eine Bestimmung der Menge in Echtzeit. Gemessen wurden die jeweiligen cDNAs für das Interleukin 6, das CCL2, für VE und N-Cadherine und die Sphingosin verstoffwechselnden Enzyme SPH Kinase und S1P Lyase. (siehe Kapitel 1)

### **2.4.4. IL-6 ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay**

#### *2.4.4.1. Blutaufbereitung und Serumgewinnung*

Das abgenommene Blut wird durch Heparin ungerinnbar gemacht und anschließend 20 Minuten lang bei 4°C mit 6000 Umdrehungen pro Minute (RPM) ultrazentrifugiert, sodass sich das Plasma von den zellulären Bestandteilen trennt. Das entspricht einer g-Kraft von 3421,08·g, bei einem Zentrifugenradius von 85 mm. Außerdem wird das Plasma durch Zugabe von Heparinsulfat ungerinnbar gemacht und somit serumähnlich. Um den Schweregrad der Sepsis zu messen, können verschiedene Proteine im Serum gemessen werden.

Da sich in der Sepsis unter anderem die IL-6 und TNF- $\alpha$  Spiegel erhöhen, kann ein ELISA dieser Substanzen im Serum diese Entzündungsreaktion bestätigen. Im Rahmen der Sepsiskontrolle haben wir uns auf die Messung des IL-6 begrenzt.

Die CRP-Produktion wird durch hohe Blutspiegel von IL-6 induziert. Das bedeutet, dass das Messen von CRP-Spiegeln keinen Mehrwert an Informationen bietet. In vergangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde außerdem gezeigt, dass hohe TNF- $\alpha$  Spiegel mit hohen IL-6 Spiegeln einhergehen.

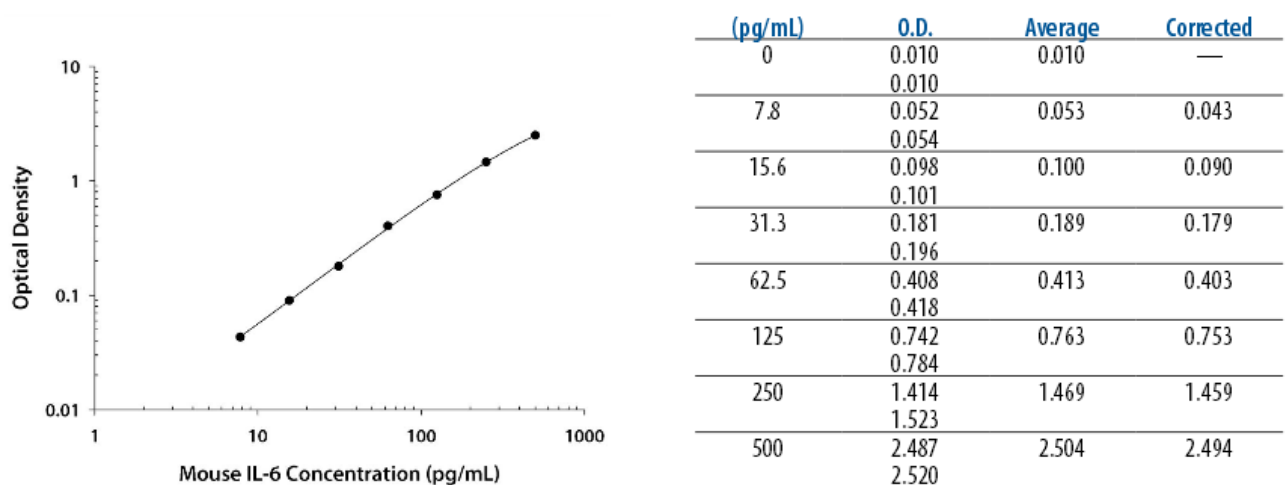
#### *2.4.4.2. Durchführung des IL-6-ELISA*

Die IL-6 Spiegel im Serum werden durch einen ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), gemessen. Der ELISA bedient sich Antikörper gegen bestimmte Proteine, die im weiteren Prozess fluoreszenzgefärbt werden, um durch eine Absorptionsmessung auf Proteinkonzentrationen im Serum zurückschließen zu können. Der Test wird durch Proben geeicht, dessen IL-6 Konzentrationen vorher

bekannt sind und die Erstellung einer Eichkurve ermöglichen. Sollten die Werte außerhalb dieser Kurve liegen, ermöglicht das Beer-Lambert'sche Gesetz, das besagt, dass für eine bestimmte Wellenlänge die Proportionalität zwischen Konzentration eines Stoffes, Extinktion dieses selben Stoffes, Dicke des Kolben, in dem sich die zu untersuchende Flüssigkeit befindet und einem konstanten Extinktionskoeffizienten definiert, die Berechnung der Konzentration. Die Höhe des IL-6 Elisawert soll nur klarstellen, ob die Maus einen septischen Krankheitsverlauf durchlaufen hat. Der von uns gesetzte Grenzwert liegt dabei bei 500 pg/mL. IL-6 Werte in früheren Versuchen waren in der Regel so hoch, dass eine Verdünnung des Serums auf 1:100 etabliert wurde, damit die Sensitivität des Testes nicht abnimmt.

Erreicht ein IL-6 Wert nicht den gewünschten Zielwert, muss von einem non-Responder ausgegangen werden, das heißt einer Maus, die entweder fehlinjiziert, oder keine Reaktion auf den LPS Reiz zeigt. Diese Maus wird dann aus der Versuchsreihe herausgerechnet. Das von R&D System veröffentlichte Protokoll für den IL-6 Elisa befindet sich im Anhang.

Mit 50 µL verdünntem Mausplasma können mit diesem Assay IL-6- Werte zwischen 7,8 und 500 pg/mL am genauesten bestimmt werden. Anschließend wird der Verdünnungsfaktor herausgerechnet. Bei einer Verdünnung beschreibt der Hersteller eine maximale Abweichung der Standardkurve von 10%. Des Weiteren beschreibt er einen logarithmischen Zusammenhang zwischen der beobachteten Absorption und der Konzentration des IL-6.



**Abbildung 31:** Die gemessene optische Dichte als Funktion der IL-6 Konzentration nach Anleitung von R&D Systems<sup>141</sup>

Bei der Eichung unserer Standardkurve war eine kleine Abweichung von dieser logarithmischen Darstellung zu beobachten. Auf dem Intervall zwischen 7,8pg/mL und 500pg/mL war die lineare Darstellung die präziseste. Die folgende Tabelle 10 gibt die Regression wieder, die die verschiedenen Modelle vergleicht hat. Es bleibt zu erwähnen, dass auch die anderen Modelle validiert werden können.

**Tabelle 10: Regressionsmöglichkeiten für die Modellisierung der IL-6-ELISA-Konzentration**

Konzentration	1.Modell	2.Modell	3.Modell	4.Modell
Modellform	Log reg	Log reg	Linear	Linear
4	0,037	0,018	0,037	0,018
8	0,035	0,025	0,035	0,025
16	0,044	0,037	0,044	0,037
31,25	0,042	0,095	0,042	0,095
62,5	0,099	0,193	0,099	0,193
125	0,183	0,276	0,183	0,276
250	0,347	0,469	0,347	0,469
500	0,851	0,862	0,851	0,862
A	19,52	12,02	0,0016	0,00169
B	0,00969	0,0108	0,0024	0,037
C	0,98	0,902		X
MSE	0,00049	0,00266	0,00120	0,000977
r			0,994	0,995
r <sup>2</sup>			0,987	0,990
Extinktionsformeln	Modell 1: $E=0,98/(1+19,52 \cdot e^{-0,00969 \cdot [IL6]})$ Modell 2: $E=0,902/(1+12,02e^{-0,0108 \cdot [IL-6]})$ Modell 3: $E=0,0016 \cdot [IL6]+0,0024$ Modell 4: $E=1,69 \cdot [IL6]+0,037$			
minima im Modell	0,048	0,069	0,0024	0,037

Die hier angegebenen Standardextinktionen sind der Mittelwert der Extinktionen zweier „Wells“. Mit einem Hochleistungstaschenrechner/Calculator der Marke „Casio ClassPad 300Plus™“ und dem Regressionsprogramm „Regressi“ wurden anschließend alle Messserien mathematisch modelliert und die mittleren quadratischen Abweichungen (MSE) bestimmt. Dabei wurden die zwei besten Messserien jeweils mit einer linearen und einer sigmoidalen Funktion modelliert. Zwar ist der MSE im ersten Modell am niedrigsten, allerdings wäre das Minimum der Funktion mit 0,048 so hoch, dass der Test keine Konzentrationen unter 16 pg/mL genau messen könnte. Das zweite und letzte Modell zeigen ein ähnliches Problem. Nur im dritten Modell liegt das Minimum der vorgeschlagenen Funktion unter dem Extinktionswert, der einer Konzentration von 4 pg/mL entspricht. Aus diesem Grund haben wir uns für ein lineares Modell bei der Berechnung der [IL-6] im heparinisierten Mausplasma entschieden. Der Hersteller schlägt zwar eine logarithmische Darstellung vor, weist aber auch darauf hin, dass immer die Form der Standardkurve der jeweiligen Messung ausschlaggebend für den mathematischen Zusammenhang sei. Auch das Beer-Lambert'sche Gesetz sieht einen solchen linearen Zusammenhang zwischen beiden Zustandsgrößen vor.

Beim Menschen sind normale IL-6 Spiegel im Bereich von 1 pg/mL und septische Werte reichen je nach Literatur bis 1000 pg/mL. In der Literatur sind ähnliche Minimalwerte für die Maus beschrieben, der Hersteller des IL-6 ELISA beschreibt aber nach LPS Injektionen von 15 µg IL-6 Werte in der Größenordnung von 30 000 pg/ml. Unerwähnt bleibt dabei Größe und Gewicht der verwendeten Mäuse.<sup>142</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitaus höhere Werte gefunden. Dies ist vor allem durch die höhere Dosis LPS zu erklären.

#### **2.4.5. Messung der LPS induzierten Aktivität verschiedener Leukozytenpopulationen anhand von MACS und FDG**

Um die Reaktion des Körpers auf das LPS besser zu verstehen und einen besseren Einblick in das Krankheitsbild der Sepsis erhalten zu können, haben wir uns zusätzlich mit der Frage beschäftigt, welche Zellen genau an dem LPS-vermittelten Schaden beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden 100mL Humanblut in Citrat-Blut Röhrchen abgenommen und der Buffy Coat aus diesem Blut isoliert. Dazu wird das Blut langsam in 45° Schräglage auf „Monocyte separation Medium“ von Promocell gegeben, das die Leukozyten von den restlichen Blutzellen nach Zentrifugation bei 440-g für 40 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse auftrennt, anschließend werden die Monozyten drei Mal 10 Minuten gewaschen, einmal bei 360-g, zwei Mal bei 200-g um Thrombozyten herauszuwaschen. Die Makrophagen werden anschließend von den restlichen Leukozyten durch den so genannten Magnetic activated cell sorting (MACS-) Assay getrennt. Das MACS beruht darauf, dass Leukozyten mit speziellen Antikörpern inkubiert werden, die an alle Zellen binden, die nicht Monozyten sind. Anschließend wird ein Antikörper appliziert, der alle gebundenen Antikörper erkennt und wiederum an sie bindet. Jener zweite Antikörper sind mit polysaccharidummantelten Eisenkomplexen gelabelt, wodurch sie und ihre Zielzellen in einem Magnetfeld zurückgehalten und gewonnen werden können (positive Selektion) oder selektiv zurückgehalten werden, um den Rest der Probe zu analysieren (negative Selektion). Da die Hauptzielzellen für das LPS/S1P bei diesem Versuch ermittelt werden sollten, wurde diese Methode verwendet um die Zellen zu trennen (sowohl positive als auch negative Selektion) und beide Ergebnisse zu miteinander zu vergleichen.

Monozyten werden bei einer Trennung mithilfe von Antikörper durch eben diese Antikörper aktiviert, was zu einer Differenzierung zu Makrophagen führen würde. Der Ansatz beim MACS ist daher alle anderen Leukozyten durch magnetisch gelabelte Antikörper in dem Magnetfeld zurückzuhalten, sodass nur die Makrophagen durchlaufen können (negative Selektion). Nach Abschalten des Magnetfeldes können auch die anderen Leukozyten gewonnen werden (positive Selektion). Die gewonnenen Zellen werden anschließend in verschiedenen Medien kultiviert (siehe Tabelle 11). Dabei wird der Effekt der immunologisch wirksamen Substanzen Interleukin 4, 10 und TNF- $\alpha$  zusammen mit LPS und S1P auf die zwei Zellpopulationen analysiert und quantifiziert. TNF- $\alpha$  wirkt als Immunstimulator auf Makrophagen aktivitätssteigernd. Die Interleukine 4 und 10 sollen als antiinflammatorische Substanzen die überschießende Immunreaktion begrenzen.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der verschiedenen Medien der Leukozytenkultur**

	IL 4, IL 10 und TNF- $\alpha$	LPS	S1P	Monozyten oder rest- liche Zellen
M1A	-	-	-	Monozyten
M1B	-	-	+	Monozyten
M1C	-	+	-	Monozyten
M1D	-	+	+	Monozyten
M2A	+	-	-	Monozyten
M2B	+	-	+	Monozyten
M2C	+	+	-	Monozyten
M2D	+	+	+	Monozyten
R1A	-	-	-	Restliche Zellen
R1B	-	-	+	Restliche Zellen
R1C	-	+	-	Restliche Zellen
R1D	-	+	+	Restliche Zellen
R2A	+	-	-	Restliche Zellen
R2B	+	-	+	Restliche Zellen
R2C	+	+	-	Restliche Zellen
R2D	+	+	+	Restliche Zellen

Um ein adäquates Korrelat des Aktivitätszustandes der beiden Zellpopulation zu bekommen, wird die Glucoseaufnahme nuklearmedizinisch durch die Gabe von Fluordeoxyglucose (FDG oder  $^{18}\text{F}$ -2FDG) bestimmt. Fluordeoxyglucose ist ein Metabolit, der D-Glucose chemisch ähnelt und damit ein Glucoseanalogon ist. Während das am häufigsten in der Natur vorkommende Fluorisotop 19 Neutronen hat, charakterisiert sich FDG durch ein radioaktives Fluor mit 18 Neutronen. Dieses zerfällt unter Abgabe eines Positrons mit einer Halbwertszeit von 109,771 Minuten.<sup>128</sup> FDG ist der am häufigsten eingesetzte Tracer für die Positronenemissionstomographie (PET), der meist für onkologische Fragestellungen eingesetzt wird. Aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Glucose (eine Fluorgruppe ersetzt hier eine Hydroxygruppe) wird FDG zunächst durch die Glucose-Transporter aufgenommen und im Sinne der Glycolyse durch die Hexokinase phosphoryliert. Da es nicht wie Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat Isomerase verstoffwechselt werden kann, aber die Zelle in dieser Form nicht verlassen kann und die Dephosphorylierung ein langwierigerer Prozess als die Phosphorylierung ist, akkumuliert das FDG vor allem in Zellen mit hoher GLUT- Dichte (z.B Tumorzellen), das heißt in Zellen mit hohem Umsatz. In diesem Falle nehmen aktivere Leukozyten mit erhöhter Stoffwechselaktivität mehr FDG auf, als jene im Ruhezustand. Durch Messung der Aktivität, das heißt der Anzahl nuklearer Zerfälle pro Zeiteinheit, können Rückschlüsse auf die Aktivität der Zelle gezogen werden. Um Artefakte durch mehr Zellen in einer Probe entgegenzuwirken, muss die Aktivität auf den Proteingehalt der Proben (und damit proportional zur Zellzahl) normiert werden. Auf diese Weise kann dann eine Beschreibung des Aktivitätszustandes der verschiedenen Leukozytengruppen stattfinden.

## 2.5. Material und Regressionsverfahren

### 2.5.1. Chemikalien

Aceton Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

Benzonase, Nuclease Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Buprenorphin (Temgesic®) Essex Pharma GmbH, München, DE

Caesiumchlorid Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

Chloroform Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

EDTA Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

Eisessig Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Ethanol 99,5% Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Formaldehyd 37% Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Isopropanol Merck KGaA, Darmstadt, DE

Kaliumhexacyanidoferrat(II) Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Kaliumhexacyanidoferrat(III) Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

KCl Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

LPS aus E. coli Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Magnesiumchlorid Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

NaCl Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

Trizma® base Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

### 2.5.2. Histologie

Acrodisc® Filter Pall, Dreieich, DE

Antibody Diluent Dako Cytomation, Hamburg, DE

Deckgläser Gerhard Menzel, Braunschweig, DE

Vecta Shield Mounting Medium with DAPI Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.5.3. Operationszubehör / Tierhaltung

1M Kaliumchlorid Baxter, Unterschleißheim, DE  
4kDa TRITC-Dextran Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE  
Atipamezol (Revertor®) CP-Pharma, Burgdorf, DE  
Durapore Pflaster 1,25 cm 3M Deutschland GmbH, Neuss, DE  
Fentanyl (Fentanyl-Janssen)-Cilag, Neuss, DE  
Flumanzenil (Anexate®) Roche, Mannheim, DE  
Futter Dox S8031-P001 PS M-Z ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE  
Futter Standard Mäuse ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE  
Käfig Eurostandard Type II L Tecniplast S.p.A., Buguggiate, IT  
Lignocel Einstreu J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, DE  
Medetomidin (Dorbene Vet®) Pfizer Tiergesundheit, Berlin, DE  
Midazolam (Midazolam Ratiopharm,) Ulm, DE  
Mikroliterspritze 710N Hamilton, Reno, USA  
NaCl 0,9% B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE  
Naloxon (Naloxon Inresa), Freiburg, DE  
Noradrenalin (Arterenol®) Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, DE  
Pilca Med ASID BONZ, Herrenberg, DE  
Portex® Fine Bore Polythene Tubing Smiths Medical, Grasbrunn, DE  
Isofluran, Forane® Salvadidas  
Sonosid Ultraschallgel ASID BONZ, Herrenberg, DE  
Sterican® 30 G x ½ B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE  
Tissue Tek Einbettmedium Sakure Fintek Europe, Zoeterwoude, NL  
Vialon 22G Kanüle BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE

### 2.5.4. Geräte

15L8 Schallkopf Siemens, München, DE  
Acuson Sequoia 512 Siemens, München, DE  
Axiocam HRc Carl Zeiss, Jena, DE

Axiovert 100M Carl Zeiss, Jena, DE

Axiovert 200M Carl Zeiss, Jena, DE

BNC Connector Block HSE, Hugstetten, DE

BX 51 Mikroskop Olympus, Hamburg, DE

CODA 2 Blutdruckgerät Kent Scientific Corporation, Torrington, USA

DC Bridge Amplifier HSE, Hugstetten, DE

T301 A/D-Wandler-Messkarte Data Translation, Bietigheim-Bissingen, DE

Heizblock Perkin Elmer, Überlingen, DE

Inkubator Binder CB150 Binder GmbH, Tuttlingen, DE

Inkubator EB55 Jouan GmbH, Unterhaching, DE

Laboport Vakuumpumpe KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE

Leica Cryostat 3050 Leica Microsystems, Wetzlar, DE

LSM510 META Carl Zeiss, Jena, DE

MiniMACS-Platten Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

My IQ real-time PCR detection system Biorad Laboratories GmbH, München, DE

OPO Chameleon Oszillator APE, Berlin, DE

Optima<sup>®</sup> L-80XP Ultrazentrifuge Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

Refraktometer PCE Instruments, Meschede, DE

Rotor Ti 70 Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

Superfrost Plus Objektträger Thermo Fisher Scientific, Waltham, DE

SW-28 Rotor Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

Tiefkühlschrank (-80) Colora UF80 450-S Colora Messtechnik GmbH, Lorch, DE

Transducer Control Unit Millar Instruments, Huston, USA

TriMScope LaVision Biotec, Bielefeld, DE

Ultra II Titan: Saphir-Laser Coherent, Dieburg, DE

Ultraschallbad (Sonorex TK52H) Bandelin electronic, Berlin, DE

Vortex-Genie 2 Bender & Hobein AG, Zürich, CH

Waage Scout Ohaus Europa, Nänikon, CH

Wärmeplatte FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim, DE

Zentrifuge: Rotina 420 R Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, DE



### 2.5.5. Software

DASYLAB National Instruments Germany GmbH, München, DE

ImageJ U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA

LSM 5 Image Browser Carl Zeiss, Jena, DE

MyIQexe. Version: 1.0.410 Biorad Laboratories GmbH, München, DE

Software Axiovision Version 4.7 Carl Zeiss, Jena, DE

### 2.5.6. Kits

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE

GoScript® Reverse Transcriptase Promega GmbH, Mannheim, DE

IL-6 ELISA Quantikine® R&D Systems Minneapolis, USA

Pan monocyte isolation kit (MACS) Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

### 2.5.7. Zellkultur

Fetal calf serum Biochrom AG, Berlin, DE

Sterican 16G Kanüle B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen,

Trypsin / EDTA 0,05% / 0,02% Biochrom AG, Berlin, DE

Zellkulturplatten, 6-well Biochrom AG, Berlin, DE

Zellkulturschalen 147,8 cm<sup>2</sup> Biochrom AG, Berlin, DE

## 2.5.8. Primer

IL6-fw	qPCR Primer (mouse)	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
IL6-rev	qPCR Primer (mouse)	AGTGGTATAGACAGGTCTGTT
Ccl2-fw	qPCR Primer (mouse)	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA
Ccl2-rev	qPCR Primer (mouse)	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
S1P-Lyase1-fw	qPCR Primer (mouse)	GCTGTGCCCATACCCTGA
S1P-Lyase1-rev	qPCR Primer (mouse)	ACGTAAGATCGAACAACAGGTG
S1P-Kinase-fw	qPCR Primer (mouse)	GGTGAATGGGCTAATGGAACG
S1P-Kinase-rev	qPCR Primer (mouse)	CTGCTCGTACCCAGCATAGTG
VECad-fw	qPCR Primer (mouse)	GTCGATGCTAACACAGGGAATG
VECad-rev	qPCR Primer (mouse)	AATACCTGGTGCGAAAACACA
Ncad-fw	qPCR Primer (mouse)	AGGCTTCTGGTGAAATTGCAT
Ncad-rev	qPCR Primer (mouse)	GTCCACCTTGAAATCTGCTGG
GAPDH-fw	qPCR Primer (mouse)	TCCTGCACCAACACCTGCTTA
GAPDH-rev	qPCR Primer (mouse)	TGGATGCAGGGATGATGTTCTGG

## 2.5.9. Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

Antikörper	Bestell-Nr	Hersteller
Goat Anti-Rabbit Alexa 488	A11008	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Cy3 Donkey Anti-Rat	712-165-153	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Kontrollantikörper	AP112	Merck Millipore, Billerica, USA
NG <sub>2</sub>	AB5320	Merck Millipore, Billerica, USA
PECAM-1	BM4086	Acris, Herford, DE
Anti-Actin, Alpha-Smooth Muscle-Cy3 mouse monoclonal	C6198	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

## 2.6. Statistik

Die im folgenden Kapitel präsentierten Ergebnisse sind mit dem jeweiligen Standardfehler angegeben (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Um festzustellen ob es sich bei den jeweiligen Gruppen um reine Trends oder signifikante Unterschiede handelt wurde vor allem mit ungepaarten T-Tests gearbeitet. Dabei wurden die verschiedenen Signifikanzniveaus auf p-Werte von jeweils unter 0,05 und unter 0,001 gesetzt und jeweils mit „\*“ und „\*\*“ markiert.

Die durchgeführten Regressionsanalysen wurden mit einem Hochleistungstaschenrechner (Calculator der Marke „Casio ClassPad 300Plus“) durchgeführt. Dabei wurde meist auch ein lineares, ein exponentiales und ein logarithmisches Model neben den anderen präsentierten Modellen getestet. Darüber hinaus wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet, um zu analysieren, wie sich ein schlechter Blutdruck auf das weitere Überleben der Mäuse auswirkt. Die Erklärung dieses Verfahrens findet sich im Kapitel 4. Stoffkonzentrationen wurden mit „[Stoff]“ markiert. Mit [mg] und [Bq] sind allerdings die Dimension von atomarem Zerfall, das heißt  $10^{-3}$  g und  $s^{-1}$  gemeint. „n“ bezeichnet die Größe der Stichprobe.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

Aufgrund der oben beschriebenen Nebenwirkungen von S1P (siehe Kapitel 1.9), die mit dem Sepsisversuch selbst interferieren könnten, wurde die Vorläufersubstanz D-Sphingosin (SPH) verwendet. Diese wurde 12 Stunden im Voraus injiziert, um sicherzustellen, dass zum Sepsisbeginn ausreichende S1P-Spiegel im Blut vorhanden sind. Um feststellen zu können, wie die Gabe von SPH ihre eigenen Metabolisierungswege langfristig beeinflusst, wurden anhand einer quantitativen Polymerase Chain Reaction (qPCR) die relativen Spiegelveränderungen der mRNAs der S1P Lyase und der SPH-Kinase im Vergleich zur mRNA der Glycerinaldehyd-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Die oben genannten Enzyme sind zusammen mit der S1P-Phosphatase die S1P- metabolisierenden Enzyme. Hierfür wurden Herz- und Nierenproben verwendet, die nach 12 Stunden entnommen und zum Teil mit LPS (PBS als Kontrolle) stimuliert wurden. Das LPS soll dabei die Sepsisbedingungen widerspiegeln.

Zusätzlich wurden die relativen mRNA Spiegelveränderungen der N- und V-Cadherine gemessen, um die Reaktion des Endothels zu quantifizieren.

Ferner wurde anhand der mRNA der Inflammationsmediatoren CCL2 und IL-6 die Entzündungsaktivität nach LPS Gabe gemessen.

#### 3.1.1. qPCR des Herzgewebes

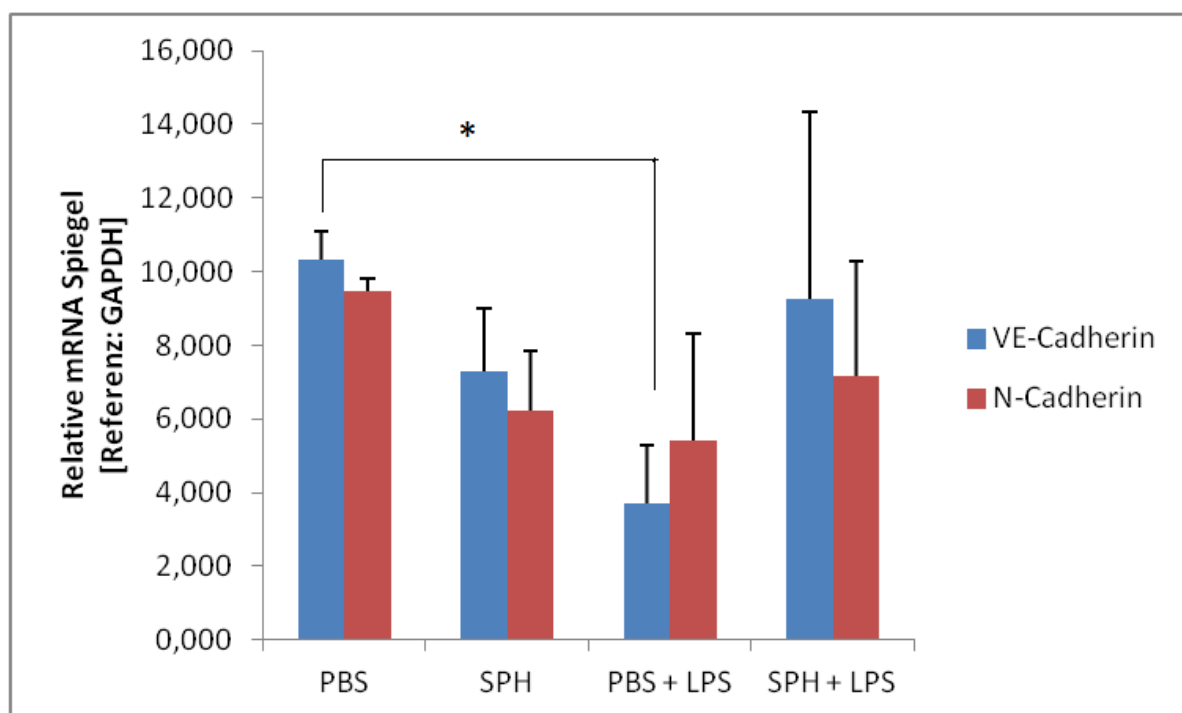


Abbildung 32: Relative mRNA-Spiegel der Adhäsionsmoleküle VE-und N-Cadherine im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen

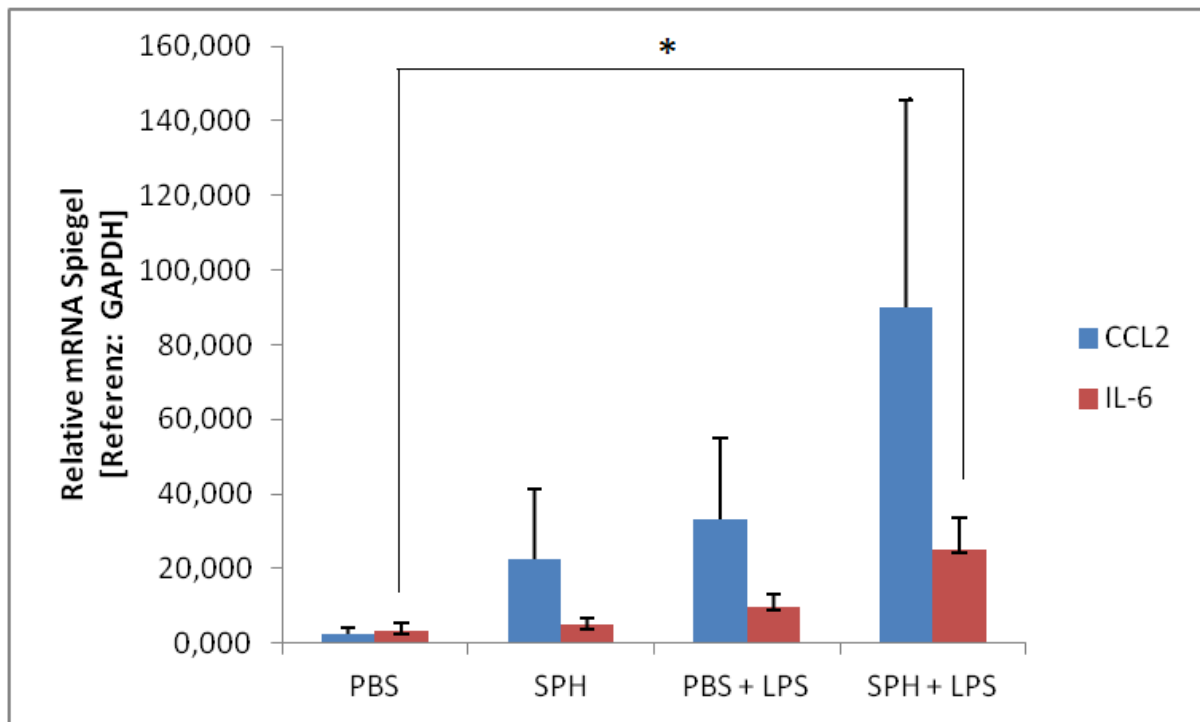
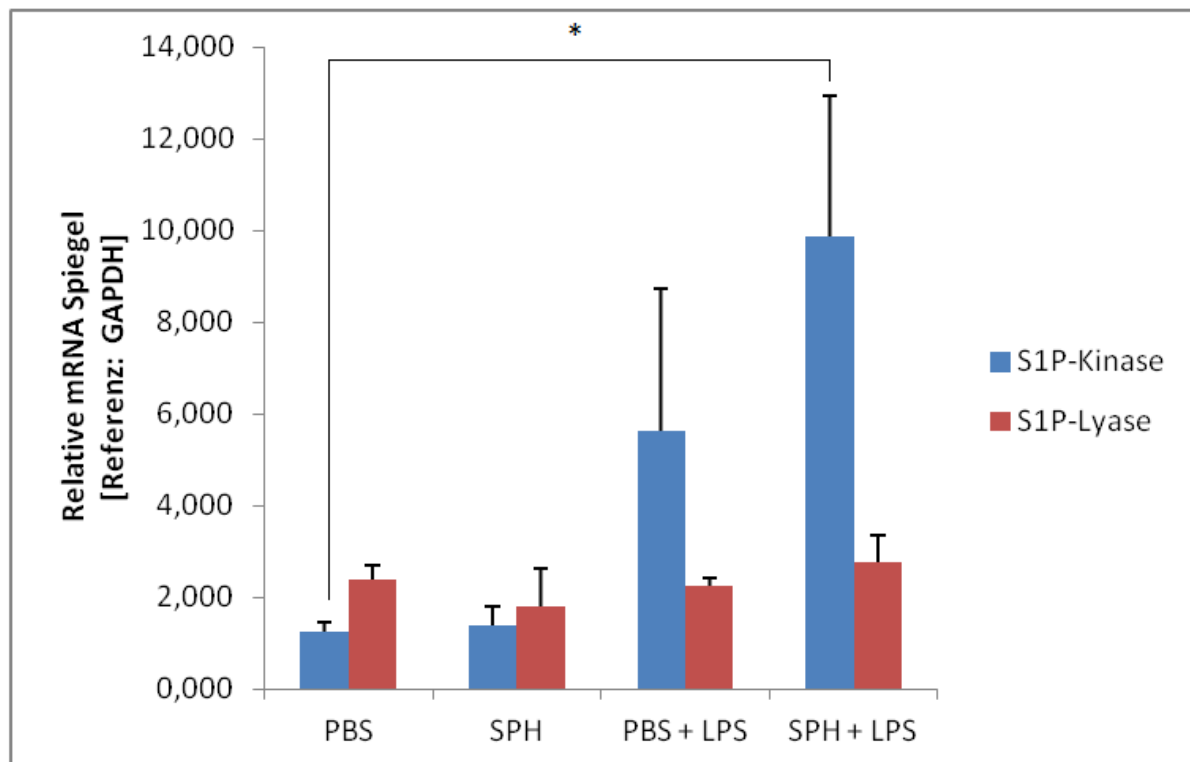


Abbildung 33: Relative mRNA-Spiegel der Entzündungsmediatoren IL-6 und CCL2 Enzyme im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen



**Abbildung 34: Relative mRNA-Spiegel der S1P-metabolisierenden Enzyme im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen**

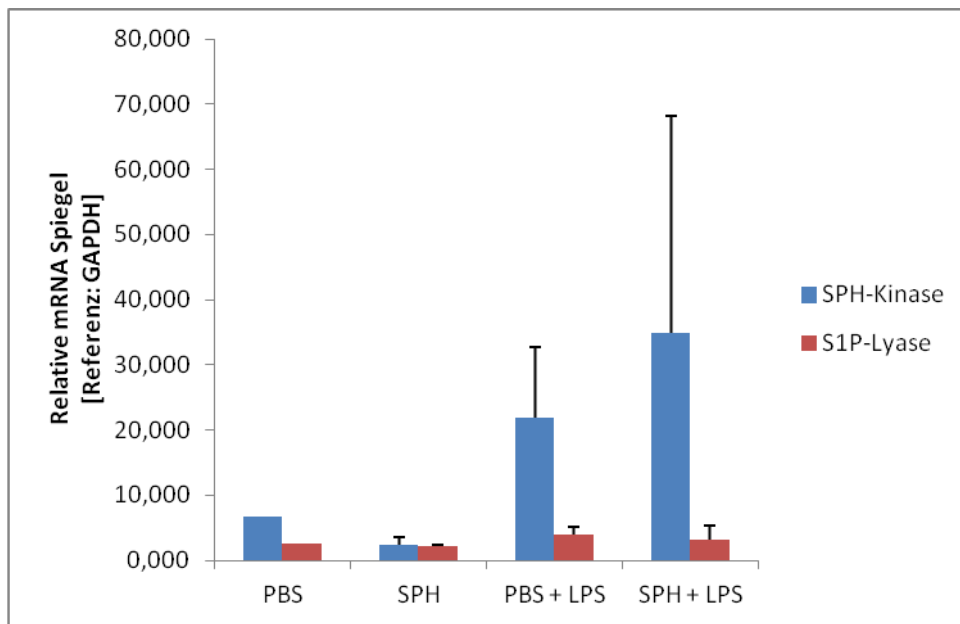
**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** stellt die Konzentration von Cadherin-mRNA bei den verschiedenen Mäusegruppen dar. Sie zeigt, dass unbehandelte Mäuse VE- und N-Cadherin-RNA-Basiswerte von jeweils  $10,3 \pm 0,8$  und  $9,4 \pm 0,4$  auf GAPDH-RNA normierte Einheiten (im Folgenden „GE“) haben. Bei Gabe von SPH sinken beide Werte ungefähr um ein Drittel auf  $7,3 \pm 1,7$  GE bzw.  $6,2 \pm 1,6$  GE. Bei Gabe von LPS vermindern sich beide Werte stärker. Die VE-Cadherinspiegel fallen um fast zwei Drittel auf  $3,7 \pm 1,6$  GE ab, während sich die N-Cadherine um weniger als die Hälfte auf  $5,4 \pm 3,9$  GE gegenüber den Ausgangswert reduzieren. Gibt man schließlich beide Substanzen hinzu, ist die Abnahme der relativen RNA Spiegel kleiner als bei der Gabe einer der Substanzen. Die VE- und N-Cadherinwerte sinken jeweils auf  $9,2 \pm 5,0$  GE bzw.  $7,1 \pm 3,1$  GE.

Im Rahmen der Quantifizierung der Entzündungsreaktion wurden die mRNAs von CCL-2 und IL-6 gemessen (Abbildung 33). Die Ausgangswerte von  $2,52 \pm 1,5$  und  $3,29 \pm 2,3$  GE nehmen während der Experimente zu. Bei der SPH Gruppe erhöht sich vor allem der CCL2-mRNA fast um das Zehnfache auf  $22,18$  GE. Letzterer Wert ist aufgrund der hohen Standardabweichung von  $18,5$  GE mit Vorsicht zu bewerten. Der IL-6-mRNA Wert steigt knapp um die Hälfte, nämlich auf  $4,89 \pm 1,7$  GE. In der LPS Gruppe ist auch eine Steigerung beider Werte zu beobachten. Die relative mRNA für CCL2 erhöht sich auf  $33,38 \pm 21,4$  und die für IL-6 auf  $9,78 \pm 3,4$  GE.

Bei der Kombination beider Substanzen lässt sich ein Summationseffekt feststellen. Beide mRNA-Werte steigen nämlich stärker an. Der für das CCL2 nimmt um das 35-fache auf  $89,90 \pm 55,7$  GE zu, während das IL-6 um das 8-fache auf  $25,3 \pm 8,4$  zunimmt. Diese Variation ist als Indiz für eine Verstärkung der Inflammationsreaktion durch beide Substanzen anzusehen.

Abbildung 34 stellt die jeweiligen mRNA-Spiegel der S1P-metabolisierenden Enzyme dar. Die Basiswerte für nicht behandelte Mäuse liegen für die RNA der SPH-Kinase und der S1P-Lyase jeweils bei  $1,26 \pm 0,2$  bzw.  $2,39 \pm 0,3$  GE. Bei den Versuchstieren, die mit SPH behandelt worden sind, verändern sich diese Werte nach 12 Stunden kaum. Die SPH-Kinase-mRNA steigt leicht auf  $1,39 \pm 0,4$  und die der S1P Lyase sinkt auf  $1,81 \pm 0,8$  GE. Nach 12 Stunden lässt sich also im Herzen nicht die in der Literatur beschriebene Induktion der SPH-Kinase durch ihr Substrat SPH beobachten. Der Spiegel der SPH-Kinase-mRNA vervierfacht sich auf  $5,61 \pm 3$  GE, während sich die S1P Lyase-mRNA mit  $2,242 \pm 0,2$  GE kaum verändert. Auch bei der Gabe beider Substanzen bleibt die S1P Lyase-mRNA Konzentration mit  $2,77 \pm 0,6$ GE weitgehend konstant. Der Spiegel der mRNA des S1P-produzierenden Enzyms SPH Kinase erhöht sich um einen Faktor 8, das heißt auf  $9,87 \pm 3,1$  GE. Dies lässt sich am ehesten durch den verzögerten Sphingolipidmetabolismus im Rahmen der Sepsis erklären.

### 3.1.2. qPCR des Nierengewebes



**Abbildung 35: Relative mRNA-Spiegel der S1P-metabolisierenden Enzyme in der Niere in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen**

Zur Vervollständigung der Daten ist mit Abbildung 35 die qPCR der S1P Kinase und Lyase in der Niere abgebildet. Der Befund der Abbildung 35 entspricht trotz der kleinen Stichprobe, dem der Abbildung 34. Die Gabe von SPH oder eine Entzündungsreaktion induzieren eine starke Expression der S1P Kinase ohne eine nennenswerte Veränderung der S1P Lyase herbeizuführen. Bekanntlich wird S1P durch die SPH Kinase synthetisiert und von der S1P-Lyase irreversibel abgebaut. Steigt die Produktion der SPH-Kinase, wie es ihre vermehrten mRNA Spiegel vermuten lassen, ist es als Zeichen dafür zu werten, dass sich das Gleichgewicht zwischen dem Edukt SPH und seinem Produkt S1P zu Gunsten des S1P verändert. Die SPH Gabe korreliert folglich mit einer Erhöhung der S1P Spiegel. Inwiefern die Erhöhung der S1P-Konzentration den Verlauf einer Sepsis beeinflusst, wird in der weiteren Ergebnisdarstellung thematisiert. In den folgenden Abschnitten werden zur Beantwortung dieser Frage die folgenden Größen erhoben: Gesamtscore, Echokardiographie, Permeabilität am Ohr der Maus, Perizyten und Endothelzellquantifizierung im Herzen und Muskel, mittlerer arterieller Blutdruck, Überlebenskurve und ELISA.

## 3.2. Der Sepsis Severity-Score

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Parameter behandelt, deren Summe den Score bildet: der Gewichtsverlust und die Verhaltensveränderung.

### 3.2.1. Gewichtsverlust

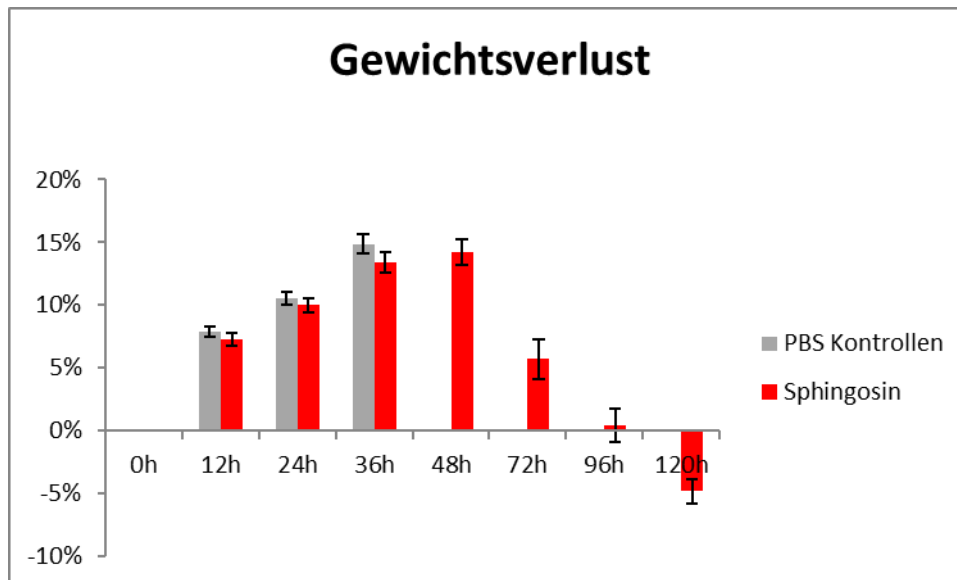


Abbildung 36: Prozentualer Gewichtsverlust als Funktion der Zeit nach Sepsisinduktion

In keiner der beiden Gruppen ragt der Gewichtsverlust in Prozent zu einem bestimmten Zeitpunkt heraus. Zu jedem der vorgegebenen Zeitintervalle haben die Werte diegleiche Größenordnung. Zwar liegt der Gewichtsverlust bei der Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer immer leicht höher als bei der SPH Gruppe, nämlich  $7,9 \pm 0,4\%$  gegen  $7,3 \pm 0,5\%$  nach 12 Stunden bzw.  $10,5 \pm 0,5\%$  gegen  $10,0 \pm 0,8\%$  nach 24 Stunden, diese Differenz von kaum 0,5 Prozentpunkten ist aber nicht ausreichend um ein relevantes Signifikanzniveau im t-Test zu erreichen. Festzustellen ist die Tatsache, dass zu den genannten Zeitpunkten die p-Werte über 0,3 liegen. Es wäre an dieser Stelle aufschlussreich gewesen, herauszufinden, welche der beiden Gruppen in der Erholungsphase der Sepsis einen besseren Score aufweist. Da keine Kontrolltiere so lang überlebt haben, ist dieser Vergleich nicht möglich. Die Verbesserung des Gewichtes tritt bei den behandelten Tieren meist zwischen 36 bis 48 Stunden nach Versuchsbeginn ein. In diesem Zeitraum kann sich das Initialgewicht unterschiedlich schnell zurückbilden: entweder schlagartig (z.B. von 12,27% auf 2,23%) oder weniger schnell (z.B. von 11,88% auf 8,92%). Bei den überlebenden Mäusen ist zudem zu vermerken, dass sich gegen Ende des Versuchs eine Gewichtszunahme von durchschnittlich  $4,98\% \pm 0,01\%$  im Vergleich zum Ausgangsgewicht einstellt.

Nicht nur der Vergleich beider Gruppen ist hier von Bedeutung, sondern auch der Vergleich innerhalb der gleichen Versuchsgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten. Wenn man mit einem t-Test die Kontrollgruppe an zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten vergleicht, sieht man an den p-Werten  $<0,001$  (z.B. Mäuse nach 12 h im Vergleich mit Mäusen nach 24 h:  $p=4,93 \cdot 10^{-4}$ ), dass der Gewichtsverlust zu jedem Zeitpunkt jeweils signifikant höher ist als 12 Stunden davor. Dasselbe gilt für die behandelten Tiere bis 36 Stunden nach Versuchsbeginn. Anschließend beginnt eine Rekonvaleszenz-



phase zwischen 48 und 72 h. Der nicht signifikante Gewichtsunterschied zwischen 36 und 48 Stunden stellt dabei den Umschlag dar.

### 3.2.2. Verhalten

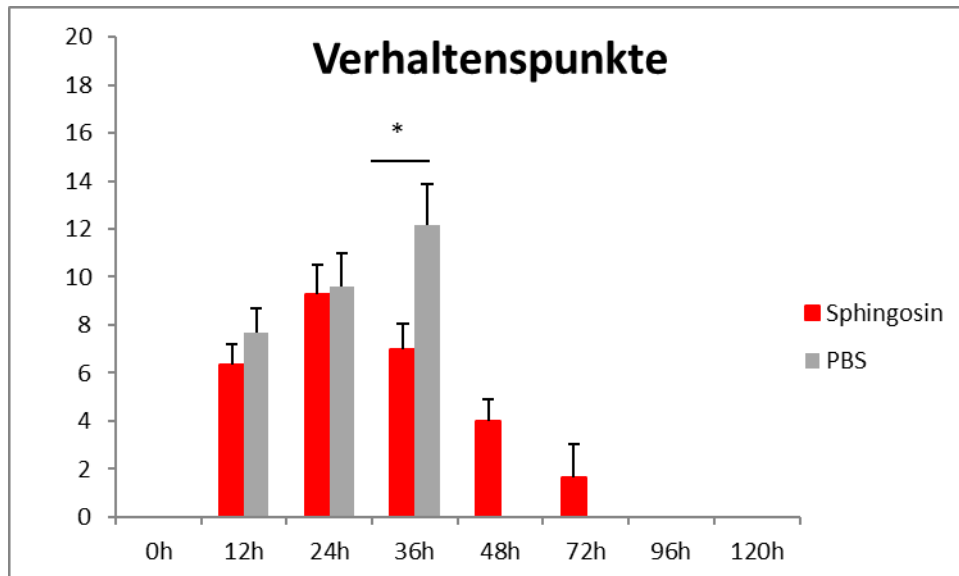


Abbildung 37: Messung der Verhaltensveränderung als Funktion der Zeit

Der zweite ausschlaggebende Wert für den Gesamtscore ist das Verhalten der Mäuse. Auch dieser ist zwischen beiden Vergleichsgruppen zu den ersten beiden gemessenen Zeitpunkten nicht signifikant höher ( $7,7 \pm 1,0$  Punkte gegen  $6,3 \pm 0,9$  Punkte nach 12 h und  $9,6 \pm 1,4$  Punkte gegen  $9,3 \pm 1,2$  Punkte nach 24h). Erst nach 36 Stunden ist ein spürbarer Unterschied festzustellen. Der Punktwert der unbehandelten Gruppe steigt weiter auf  $12,1 \pm 1,7$  Punkte, während der der behandelten Gruppe auf  $7,0 \pm 1,0$  Punkte fällt. Der t-Test, der die Verhaltenswerte nach 36 Stunden vergleicht, ergibt einen p-Wert von 0,022 und damit ein signifikant besseres Verhalten der behandelten Mäuse nach 36 Stunden. Der t-Test spiegelt an dieser Stelle ein weiteres Phänomen wieder. Während die nicht behandelten Mäuse sich über den ganzen Versuch sowohl im Verhalten als auch im Bereich der Gewichtsabnahme kontinuierlich verschlechtern, zeigen die SPH behandelten Mäuse Zeichen einer Remission. Diese beginnt zwischen den Zeitpunkten 24 und 36 Stunden, da hier der Durchschnittsscorewert des Verhaltens zum ersten Mal sinkt. Das Körpergewicht der Mäuse fängt im Schnitt erst später an sich zu stabilisieren. Zwischen 36 und 48 Stunden nehmen nur ein Drittel der Überlebenden SPH Mäuse an Gewicht zu, das Körpergewicht der anderen stabilisiert sich erst zwischen 48 und 72 Stunden.

### 3.2.3. Gesamtscore

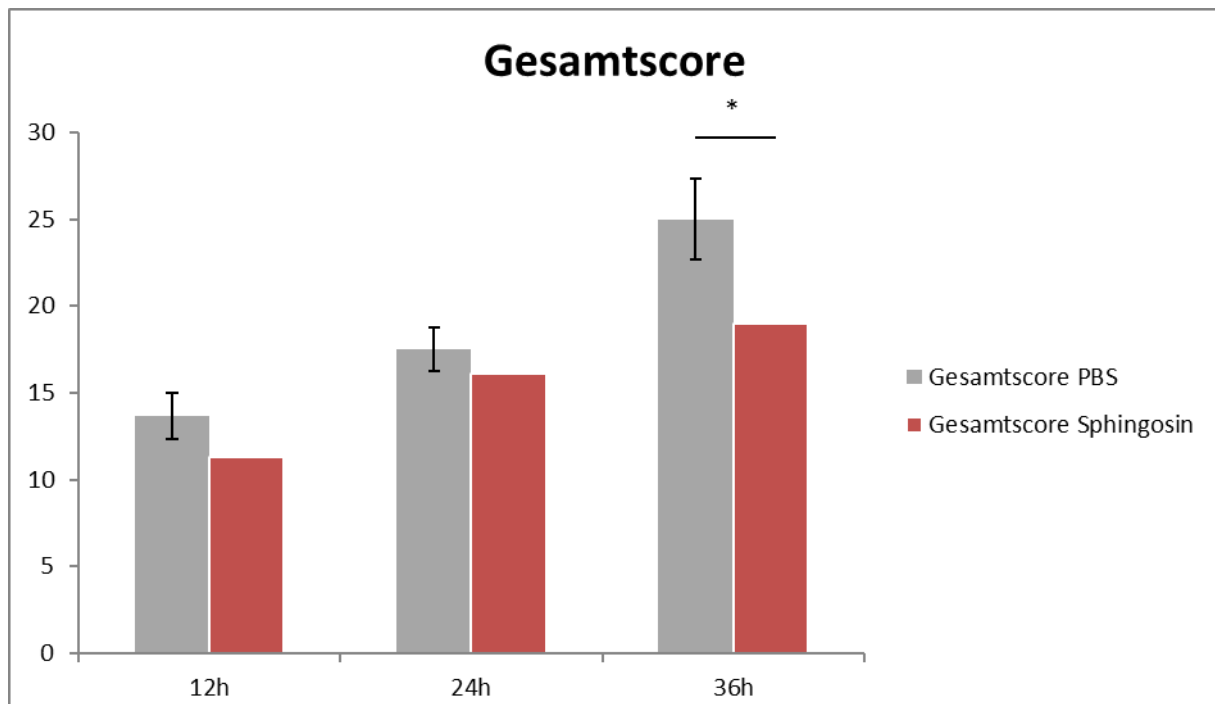


Abbildung 38: Der Gesamtscore, Summe aller Parameter als Funktion der Zeit nach LPS-Gabe

Die Summe der beiden oben genannten Parameter, d.h. Gewichtsverlust und Verhalten mit den weiteren Parametern Dyspnoe, Aszites und Schmerz ergibt den Gesamtscore. Die Komponenten des Scores sind diskrete Werte, die nur ein Vielfaches von 5 annehmen. Der dabei maximal gemessene Wert liegt bei 40 Punkten. Mäuse mit mehr als 20 Punkten werden beendet und damit aus der Statistik genommen. Daher ist es verständlich, dass trotz seiner Zusammensetzung aus vielen Parametern und der interindividuell unterschiedlich tolerierten Sepsis, der Score (durch einen  $n=15$ ) keiner hohen Standardabweichung unterliegt (maximal 2,2 bei einem mittlerem Punktwert von 27,9 nach 36 h). Des Weiteren liegt das auch an der Zahl der verwendeten Mäuse ( $n=15$ ).

Im Gesamtscore ist dieselbe Tendenz zu verzeichnen wie in den Graphiken zum Gewichtsverlust und zum Verhalten. Initial steigt der Mittelwert in den ersten 36 Stunden in beiden Gruppen. Zunächst beträgt er  $13,6 \pm 1,2$  Punkte für die Kontrollgruppe und  $11,3 \pm 1,0$  für die mit SPH behandelte Gruppe. 12 Stunden später sind es jeweils  $17,5 \pm 1,3$  und  $16,1 \pm 1,3$  Punkte und 36 Stunden nach Sepsisinduktion bezieht sich der Wert für die Kontrollgruppe auf  $27,9 \pm 2,2$  und auf  $19,5 \pm 1,4$ . Nach 36 Stunden ist der Score in der Kontrollgruppe signifikant höher ( $p=0,0082$ ). Sie schneiden daher schlechter ab.

Diese Methode zum Erfassen des Gesundheitszustandes der Maus lässt sich durch einen t-Test innerhalb der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten validieren. Vergleicht man die Scorewerte zu den Zeitpunkten 12, 24 und 36 h untereinander, steigen sie mit der Versuchsdauer signifikant an.

### 3.3. Echokardiographie

Der bessere Score der behandelten Mäuse könnte durch ein kardiovaskuläres Korrelat zu erklären sein. Um dieses zu analysieren, wurden zum Zeitpunkt 12 Stunden jeweils 6 PBS Kontrolltiere und 6 behandelte Mäuse echokardiographiert. Als präseptische Kontrolle fungieren hierbei 4 Sonographien gesunder Mäuse.

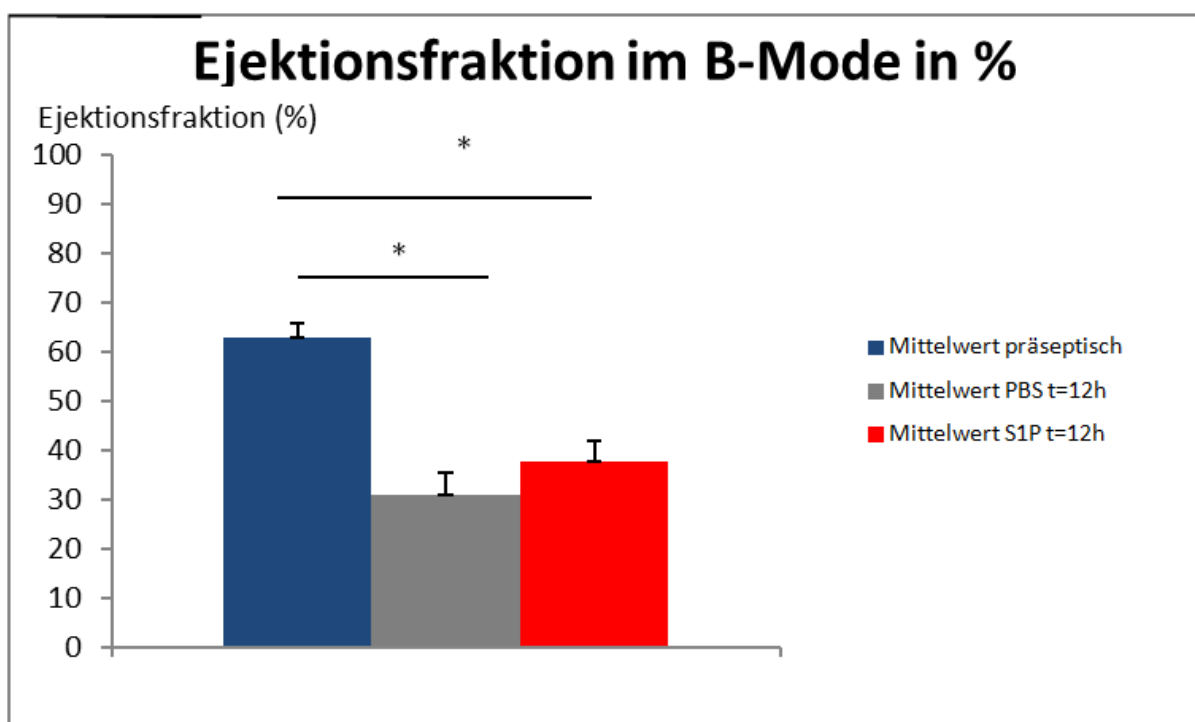


Abbildung 39: Ejektionsfraktionsverlust 12 Stunden nach Sepsisbeginn

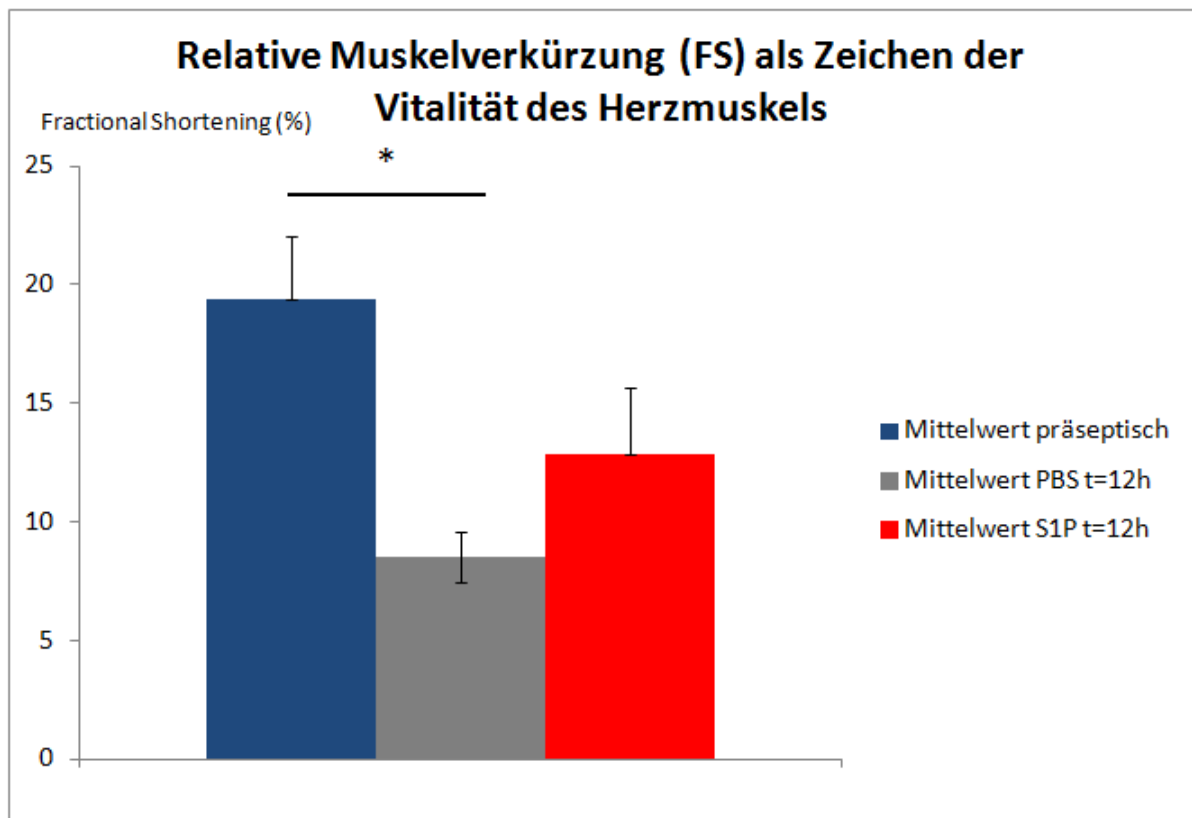


Abbildung 40: Verlust des Fractional Shortenings 12 Stunden nach Sepsisinduktion

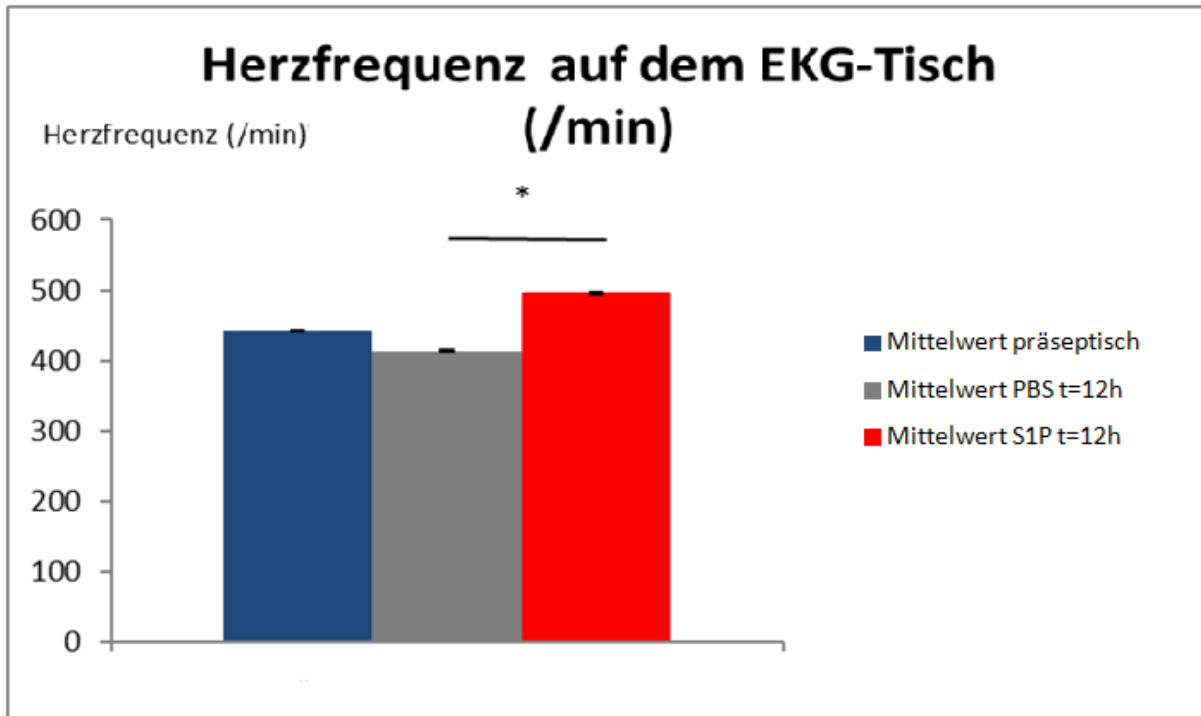


Abbildung 41: Wirkung der Sepsis auf die Herzfrequenz

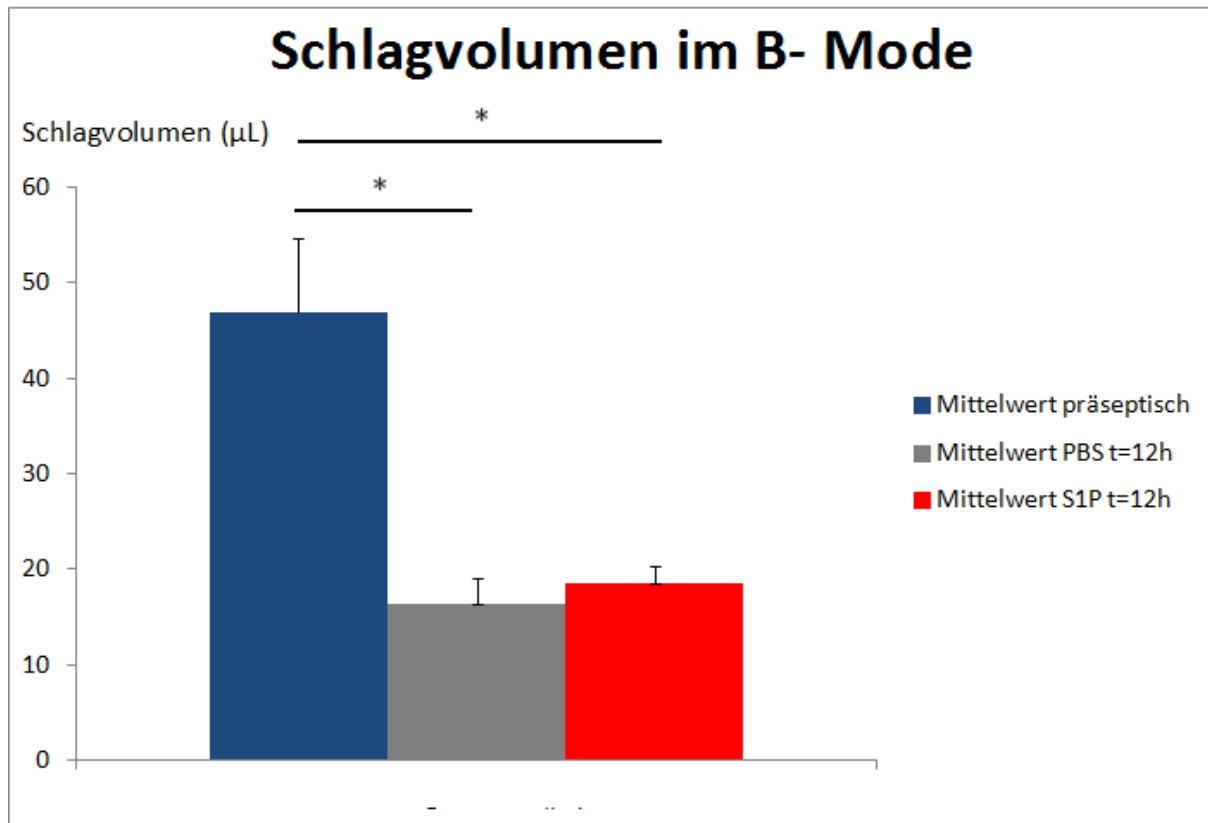


Abbildung 42: Auswirkung der Sepsis auf das Schlagvolumen

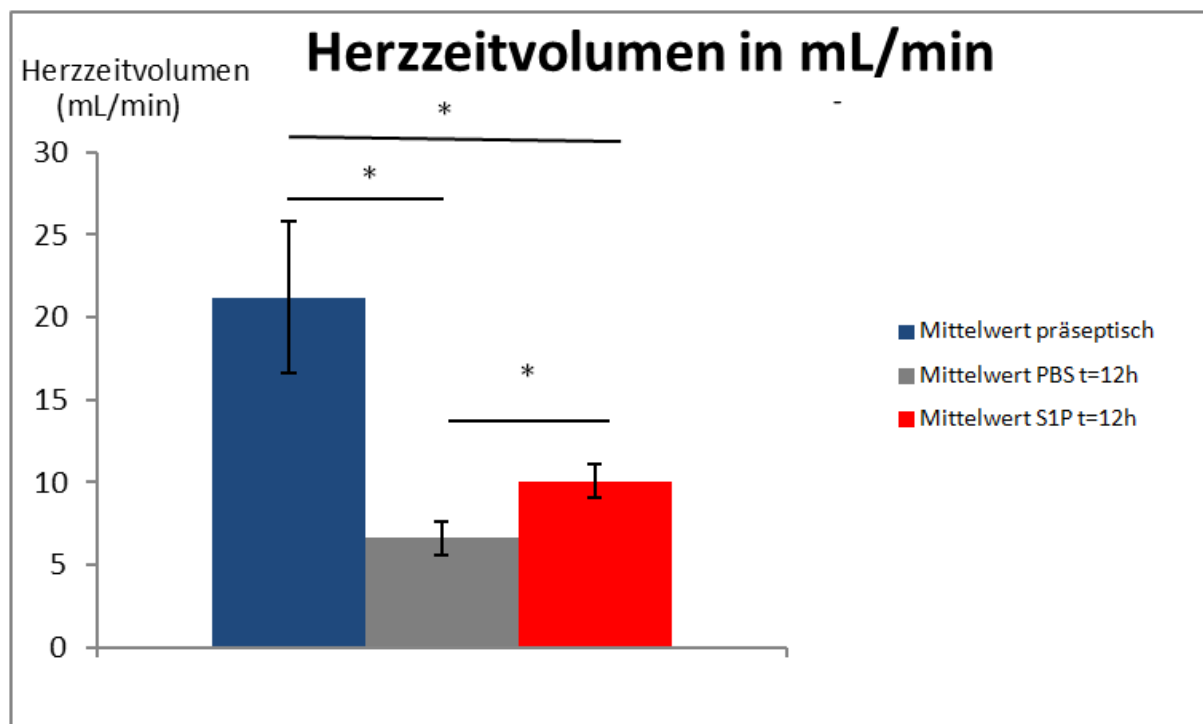


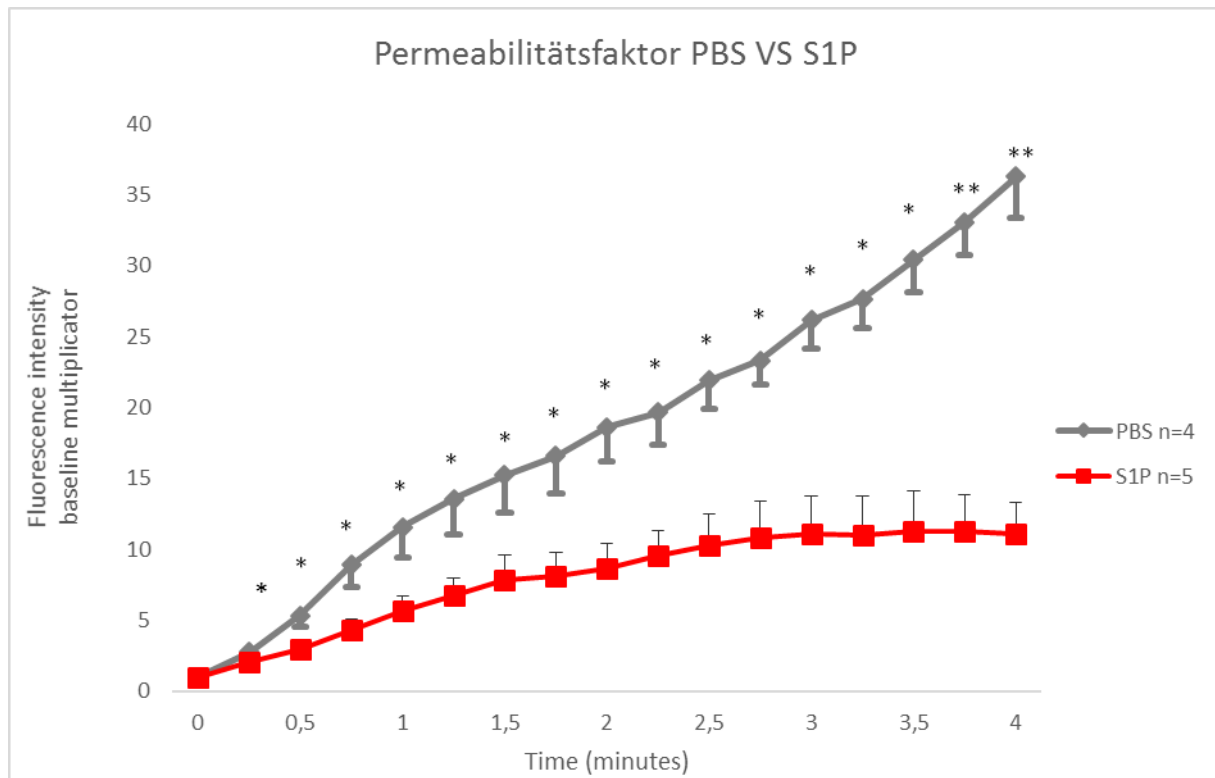
Abbildung 43: Beeinflussung des Schlagvolumens durch die Sepsis

Der septische Zustand der Mäuse lässt sich am besten am Verlust der Inotropie beobachten. Die spürbare Abnahme von Schlagvolumen, Ejektionsfraktion und der relativen Muskelverkürzung (Frac-

tional Shortening, oder FS) 12 Stunden nach Sepsisbeginn beschreibt das Unvermögen der Mäuse eine suffiziente Kreislauffunktion aufrechtzuerhalten. Die Ejektionsfraktion (EF) von  $62,7\% \pm 3,1\%$  bei Mäusen ohne Sepsis sinkt auf  $30,9 \pm 4,5\%$  bei Kontrolltieren und  $37,6 \pm 1,7\%$  bei behandelten Mäusen. Beim Menschen gilt eine EF unter 45% als mittelgradig eingeschränkt und bei Werten unter 30% als stark eingeschränkt. Die septischen Mäuse fallen daher schon nach 12 Stunden in die Kategorie der mittelgradig eingeschränkten Ejektionsfraktion. Der zweite Parameter der Inotropie, das Fractional Shortening (FS) liegt bei gesunden Mäusen bei  $19,3 \pm 2,6\%$  und sinkt im Laufe der Sepsis auf jeweils  $8,5 \pm 1,1\%$  bei der PBS Gruppe und  $12,9 \pm 1,1$  bei der SPH Gruppe ab. Hierbei ist anzumerken, dass schon der bei gesunden Mäusen gemessene Wert beim Menschen für eine leichte Funktionseinschränkung sprechen würde. Außerdem ist zwar der Vergleich zwischen Kontrollwert und PBS signifikant ( $p < 0,05$ ), im Vergleich mit behandelten Mäusen ist der Wert gesunder Mäuse nicht mehr signifikant besser  $p = 0,18$ . Sowohl bei den septischen Kontrolltieren als auch bei den S1P Mäusen ist das Schlagvolumen signifikant zurückgegangen. Es liegt mit jeweils  $16,4 \pm 2,6\mu\text{L}$  und  $18,6 \pm 0,7\mu\text{L}$  weit unter dem Ausgangswert von  $47,0 \pm 7,7\mu\text{L}$ . ( $p$ -Werte vs. Kontrollen beide  $< 0,05$ ). Der Wert, der die besseren Scores erklären könnte, ist die Herzfrequenz. Die Basis Herzfrequenz beziffert sich auf  $442,2 \pm 34,3$  Schläge/min (BPM). Diese ist 12 Stunden nach Sepsisinduktion ohne Behandlung auf  $413,3 \pm 25,1$  BPM gesunken.

Im Rahmen der septischen Hyperzirkulation ist zu erwarten, dass die Herzfrequenz in der frühen Phase kompensatorisch ansteigt. Die zusätzliche Narkose mit Isofluran verstärkt die Vasodilatation und erhöht damit die Herzfrequenz, die zur Erhaltung des Kreislaufes notwendig ist. Eine Abnahme dieser Herzfrequenz, wie sie hier bei den Kontrollen auftritt, ist das erste Zeichen für die beginnende Insuffizienz der kompensatorischen Mechanismen nach 12 Stunden. Bei therapierten Tieren steigt die Herzfrequenz auf  $495,9 \pm 8,7$  BPM an, sodass bei ähnlichem Schlagvolumen sowohl die Herzfrequenz der behandelten Tiere als auch das Herzzeitvolumen (auch HZV oder Cardiac Output) mit  $10,1\text{mL/min}$  signifikant höher sind als die Pulsfrequenz und das HZV der septische PBS-Mäuse (mit  $6,7 \pm 1,0$ ), ohne dass dabei ein signifikanter Unterschied zwischen aseptischen Mäusen und behandelten Mäusen in der Herzfrequenz entsteht. Im Bereich des HZV sind allerdings septische Mäuse aufgrund der niedrigeren Werte (vor allem durch das Schlagvolumen) unabhängig von der Behandlung signifikant schlechter als aseptische Sham-Mäuse. Dennoch ist die erhöhte Herzfrequenz ein Zeichen dafür, dass die behandelten Mäuse länger in der Lage sind, die endotheliale Dysfunktion kardial zumindest partiell zu kompensieren.

### 3.4. Zwei Photonen Mikroskopie



**Abbildung 44:** Die Quantifizierung der Permeabilität durch die extravasierte Flüssigkeit zeigt eine deutlichere vaskuläre Dysfunktion in den nicht behandelten Tieren

Der Vergleich zwischen der Permeabilität an Mausohrkapillaren in der Sepsis mit gesunden Mäusen ermöglicht es, über die extravasierte Flüssigkeit den Kapillarschaden zu quantifizieren, der durch die Sepsis hervorgerufen wird. Zusätzlich wird hier die Erklärung für die hämodynamische Instabilität der Mäuse vermutet.

Wenn man den generellen Verlauf beider Kurven analysiert, fällt auf, dass die Sepsis in beiden Versuchsgruppen zu einer Zunahme der extrazellulären Fluoreszenz führt. Dies bedeutet also, dass die Permeabilität der Kapillaren 12 Stunden nach Sepsisinduktion ansteigt. Über die Beobachtungsdauer von 4 Minuten erhöht sich die extrazelluläre Fluoreszenz um den Faktor  $36,3 \pm 2,9$  in der Kontrollgruppe. Währenddessen steigt dieselbe Permeabilität in der behandelten Gruppe um das 11-fache an. Der Faktor  $11,1 \pm 2,2$  spricht bei den SPH-behandelten Mäuse zwar für eine starke Permeabilitätszunahme, diese limitiert sich aber auf weniger als ein Drittel der in der Kontrollgruppe gemessenen Werte. Eine Erhöhung um den Faktor 11 ist bei den Kontrolltieren schon nach 1 Minute messbar ( $11,6 \pm 2,2$ ), während die behandelte Gruppe zu diesem Zeitpunkt lediglich eine Erhöhung um den Faktor  $5,7 \pm 1,0$  aufweisen.

## 3.5. Histologie

Die Gefäße unterliegen stetigen Veränderungen. Für seine stetige Integrität sind die Beschaffenheit der Barriere und die Zellzahl wichtig. Die Dichtigkeit der Barriere wurde anhand der 2-Photonen Mikroskopie analysiert. Für die Analyse der Zellzahl, wurden mikroskopische Schnittbilder des Herzens und der Muskel durchgeführt und mittels einer Immunfärbung Perizyten und Endothelzellen sichtbar gemacht. Sham-Mäuse, die keine Sepsis durchliefen und weitere aseptische Kontrollen erhielten SPH vor der Organentnahme, um Basiswerte zu bestimmen. In diesem Sinne wurde eine quantitative Verlaufsanalyse nach 0, 12, 24 und 36 Stunden von Perizyten und Endothelzellzahlen durchgeführt. Die als Ausgangswert geltenden Sham-Mäuse zeigten (mit knapp 4700 Perizyten/mm<sup>2</sup>-Herzgewebe) ähnliche Werte wie in unseren Vorarbeiten.<sup>53</sup> In dieser Arbeit sind 4500 Perizyten/mm<sup>2</sup> beschrieben.

### 3.5.1. Ergebnisse im Herzmuskel

Bei Tieren, die kein LPS bekamen, liegen die Perizytenzahlen bei  $4702,0 \pm 257,2/\text{mm}^2$  ohne SPH und  $5162,7 \pm 188,9/\text{mm}^2$  Herzgewebe mit vorheriger SPH-Gabe. Bei der SPH-Gruppe ohne Sepsis wurde 12 Stunden gewartet, damit die Substanz wirken konnte. Die Gabe von SPH steigert zwar die initiale Perizytenzahl um knapp 450 Perizyten/mm<sup>2</sup>, vor Beginn des Versuches reicht dieser Unterschied nicht aus, um ein Signifikanzniveau unter 0,05 zu erreichen. Außerdem lässt sich diese Beobachtung nicht auf Endothelzellen erweitern. Hier liegen beide Gruppen vor der Sepsis gleichauf. Wichtiger ist hier der zeitliche Verlauf.

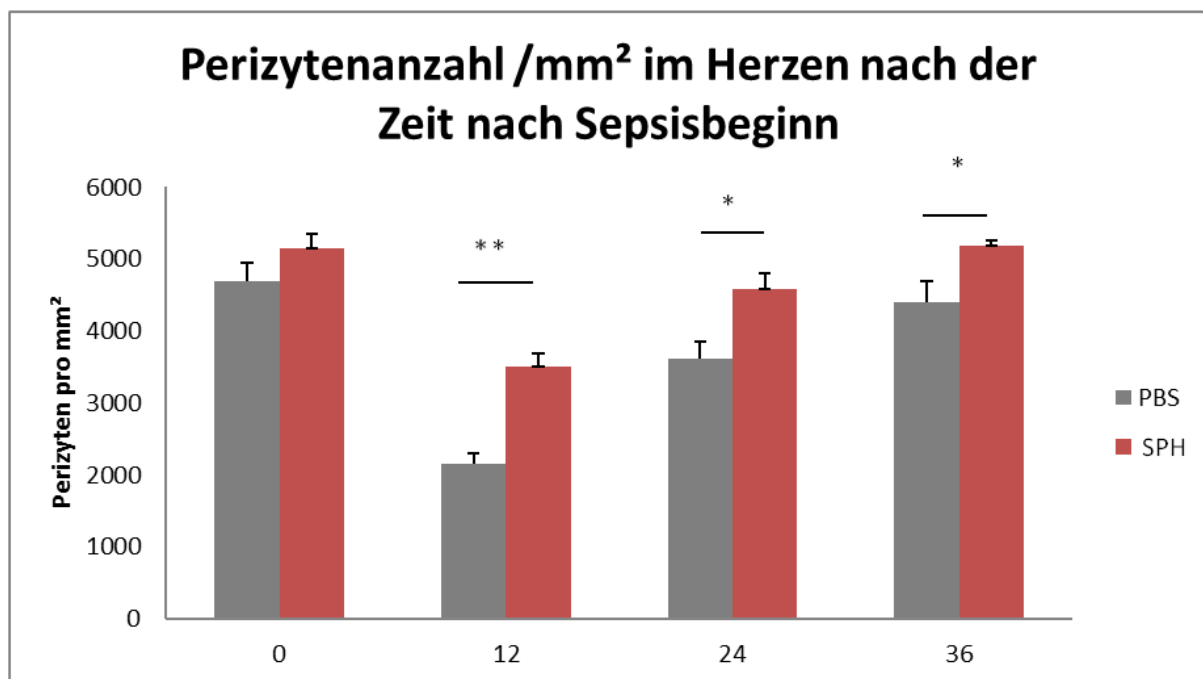


Abbildung 45: Perizyten im zeitlichen Verlauf der LPS –Sepsis. Hier ist die durch LPS induzierte Abnahme der Zellzahl genauso wie eine Erholungsphase in beiden Gruppen zu sehen.



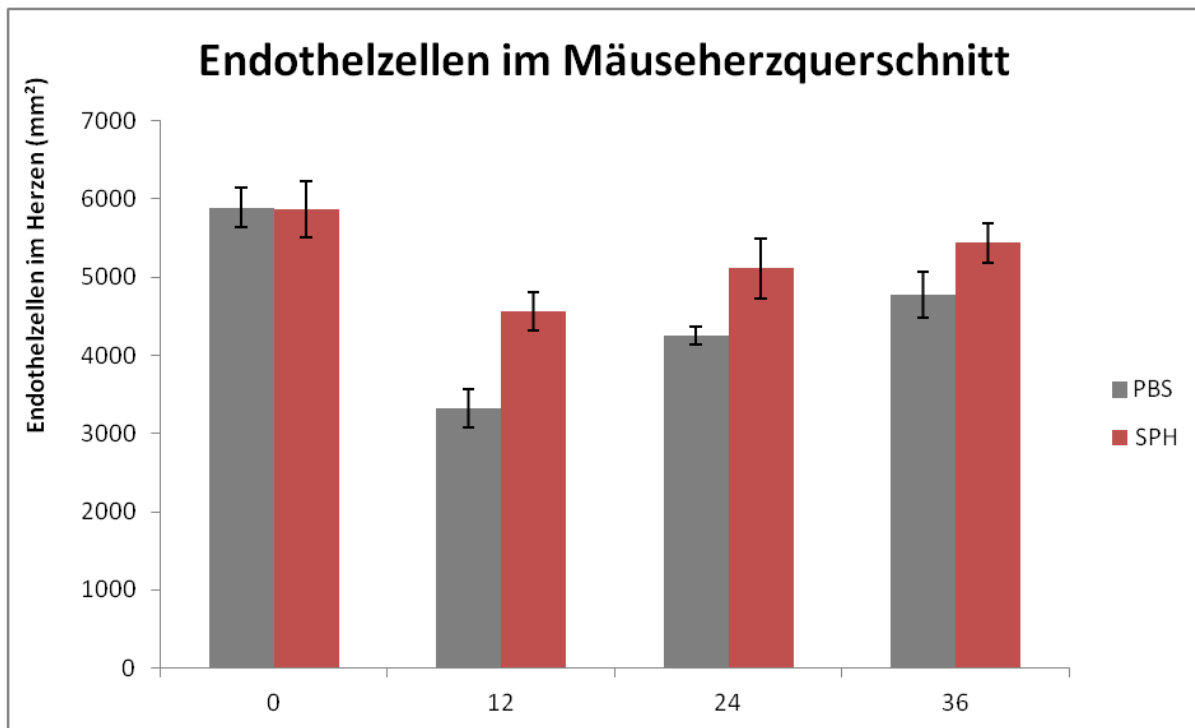


Abbildung 46: Endothelzellen im zeitlichen Verlauf der Sepsis

Die Kontrollmäuse (n=5) weisen nach 12 Stunden im Durchschnitt  $108,8 \pm 8,0$  Perizyten pro Gesichtsfeld (das heißt knapp  $2149,9 \pm 157,9/\text{mm}^2$ ) und  $176,8 \pm 12,4$  Endothelzellen/HPF (=  $3491,4 \pm 244,4/\text{mm}^2$ ) auf. Dies entspricht einem Perizyten/Endothelzellquotienten (PC/EC) von 0,64. Ein Perizyt liegt also durchschnittlich 1,6 ( $1/0,64$ ) Endothelzellen auf.

Die mit S1P behandelten Mäuse hatten mit  $177,4 \pm 9,2$  Perizyten/HPF ( $3505,0 \pm 181,2/\text{mm}^2$ ) und  $231,1 \pm 12,3$  Endothelzellen/HPF ( $4565,3 \pm 242,6/\text{mm}^2$ ) eine signifikant höhere Zelldichte für beide Zelltypen. Der PC/EC Quotient der behandelten Mäuse ist außerdem mit 0,79 um 15 Prozentpunkte höher, das heißt, dass trotz der höheren Zelldichte die Perizyten weniger von der Inflamationsreaktion betroffen sind als die Endothelzellen. In der Tat liegt ein Perizyt nur noch 1,3 Endothelzellen auf.

### 3.5.2. Ergebnisse im Skelettmuskel

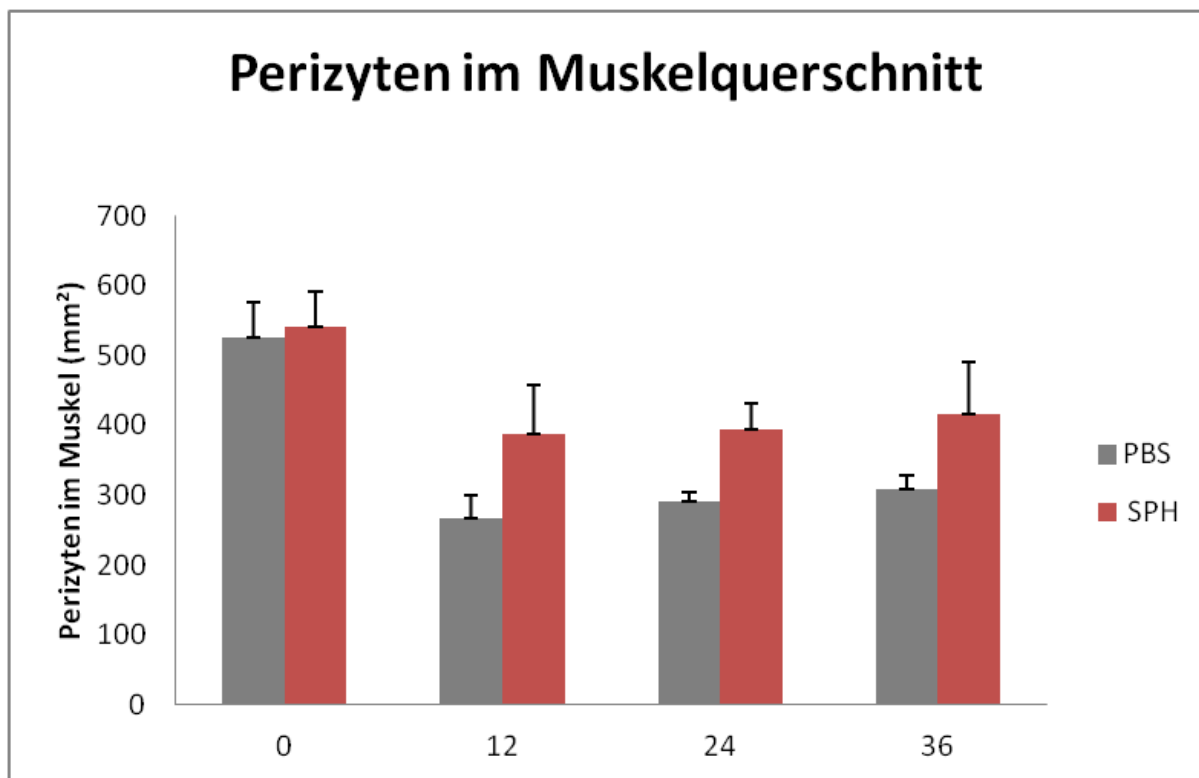


Abbildung 47: Perizyten im Skelettmuskel im zeitlichen Verlauf der Sepsis

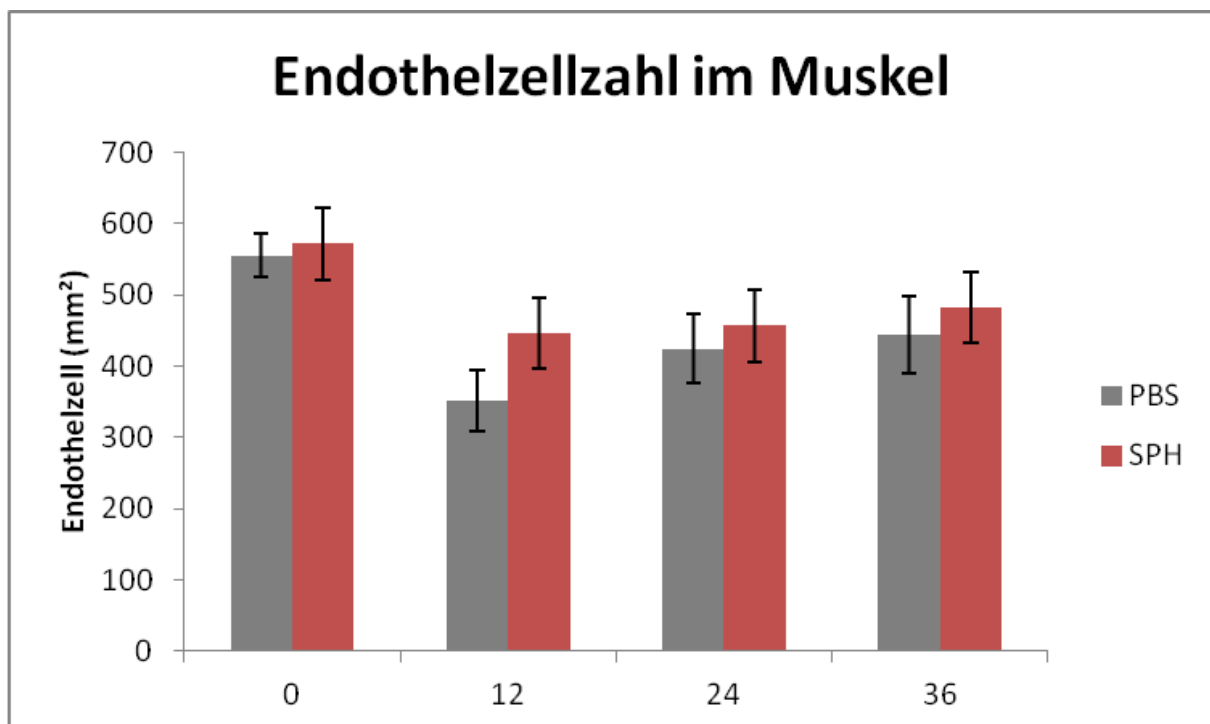


Abbildung 48: Endothelzellen im zeitlichen Verlauf der Sepsis im Skelettmuskel

Im peripheren Muskel sind grundsätzlich weniger Gefäßzellen zu finden als im Herz. Die Kontrollgruppe hatte mit durchschnittlich  $13,47 \pm 1,72$  ( $266,07 \pm 33,98/\text{mm}^2$ ) Perizyten ( $n=5$ ) weniger als die mit S1P behandelte Gruppe mit  $19,65 \pm 3,85$  ( $388,18 \pm 76,15/\text{mm}^2$ ) Perizyten/HPF und mit  $17,80 \pm 2,15$  ( $351,67 \pm 42,53/\text{mm}^2$ ) gegen  $22,63 \pm 5,28$  ( $447,04 \pm 104,33/\text{mm}^2$ ) weniger Endothelzellen ( $n=5$ ). Beide Unterschiede sind nicht signifikant. Vergleicht man die relative Geschwindigkeit, mit der die Anzahl beider Zelltypen sinkt, fallen die Endothelzellen schneller ab. In der Kontrollgruppe lässt sich ein Verlust von 36% verzeichnen. Sie sinken von initial  $28,12 \pm 1,54$  Endothelzellen/HPF ( $555,46 \pm 30,42/\text{mm}^2$ ) auf  $17,8 \pm 2,15$  Endothelzellen/HPF ( $351,60 \pm 42,47/\text{mm}^2$ ) nach 12 Stunden. Auch in der behandelten Gruppe sinken die Endothelzellzahlen von anfangs  $28,96 \pm 2,54$  EC/HPF ( $572,05 \pm 50,17/\text{mm}^2$ ) um 22% auf  $22,63 \pm 5,28$  EC/HPF ( $447,01 \pm 104,30/\text{mm}^2$ ). Die Behandlung scheint den Zellverlust auch hier reduzieren zu können.

In beiden Organen lässt sich ein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen. Die mit Sphingosin behandelte Gruppe ist in der Lage mehr Perizyten und Endothelzellen zu mobilisieren, was für eine intakte Gefäßstruktur unabdingbar ist. Außerdem scheint diese Rekrutierung bei Perizyten stärker zu sein als bei Endothelzellen, da die PC Zahlen prozentual schneller steigen. Ob es sich hier nur um eine Rekrutierung von Perizyten handelt und ob es nicht zusätzlich eine anti-apoptotische Wirkung gibt, kann mit einer Zellkultur geklärt werden.

### 3.5.3. Verlaufanalyse anhand des Beipfels der Perizyten im Herzen

Im weiteren Verlauf der Sepsis steigen die Perizytenzahlen im Herzen in der PBS Gruppe von  $2149,9 \pm 157,9$  Perizyten/ $\text{mm}^2$  nach 12 Stunden und  $3609,5 \pm 238,1/\text{mm}^2$  nach 24 Stunden bis auf  $4398,3 \pm 308,4$  Perizyten/ $\text{mm}^2$ , das heißt, dass nach 36 Stunden die Maus fast wieder dieselbe Perizyten-dichte hat, wie eine durchschnittliche aseptische Maus. Die Erholung kann unter der SPH- Gabe beschleunigt werden. Der schon nach 12 Stunden signifikant höhere Wert von  $3505,0 \pm 181,2/\text{mm}^2$  (30% Verlust gegenüber dem Initialwert) steigt nach 24 Stunden auf  $4594,6 \pm 206,7$  Perizyten/ $\text{mm}^2$  (11% Verlust und beinahe der Wert einer normalen gesunden Maus) um nach 36 Stunden bei  $5202,0 \pm 74,1$  zu liegen (vollständige Erholung, bei leichter Erhöhung von 0,76%). Eine ähnliche Erholung erfährt auch das Endothel. Die initiale Abnahme um 44% bzw. 22% bei behandelten Mäusen reduziert sich innerhalb von 36 Stunden in beiden Gruppen auf jeweils 18 und 7%.

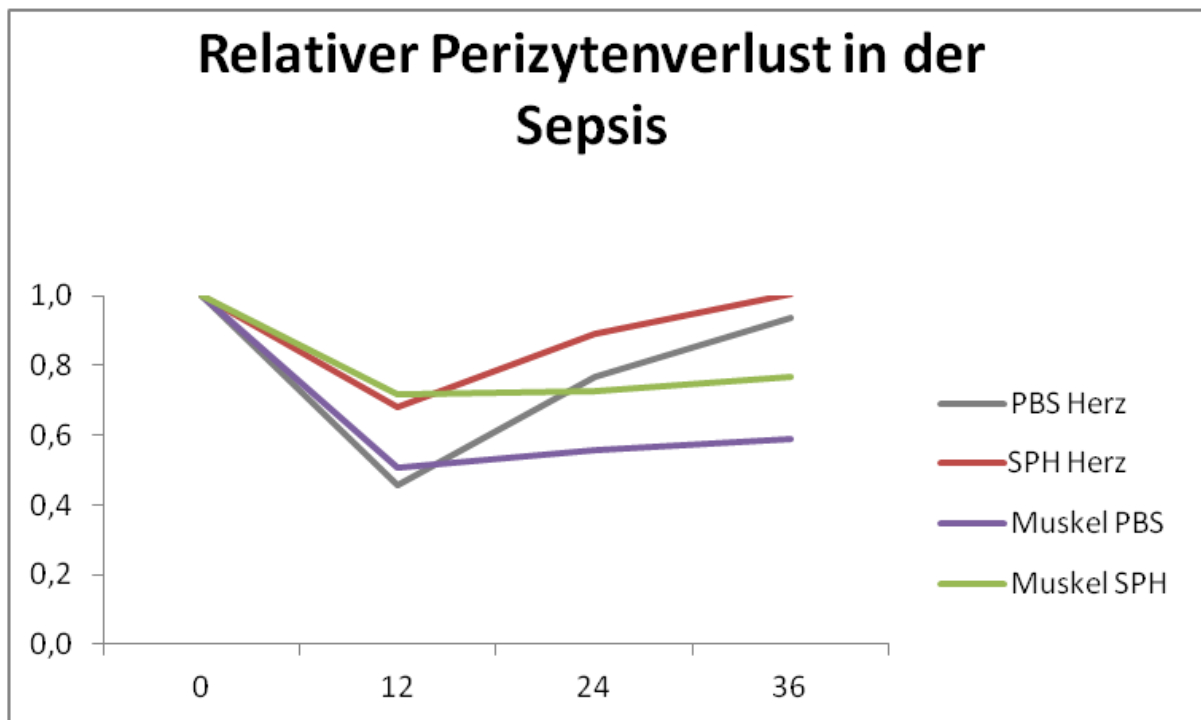


Abbildung 49: Der Perizytenverlust kann in der Sepsis durch S1P verringert werden (n=4x4)

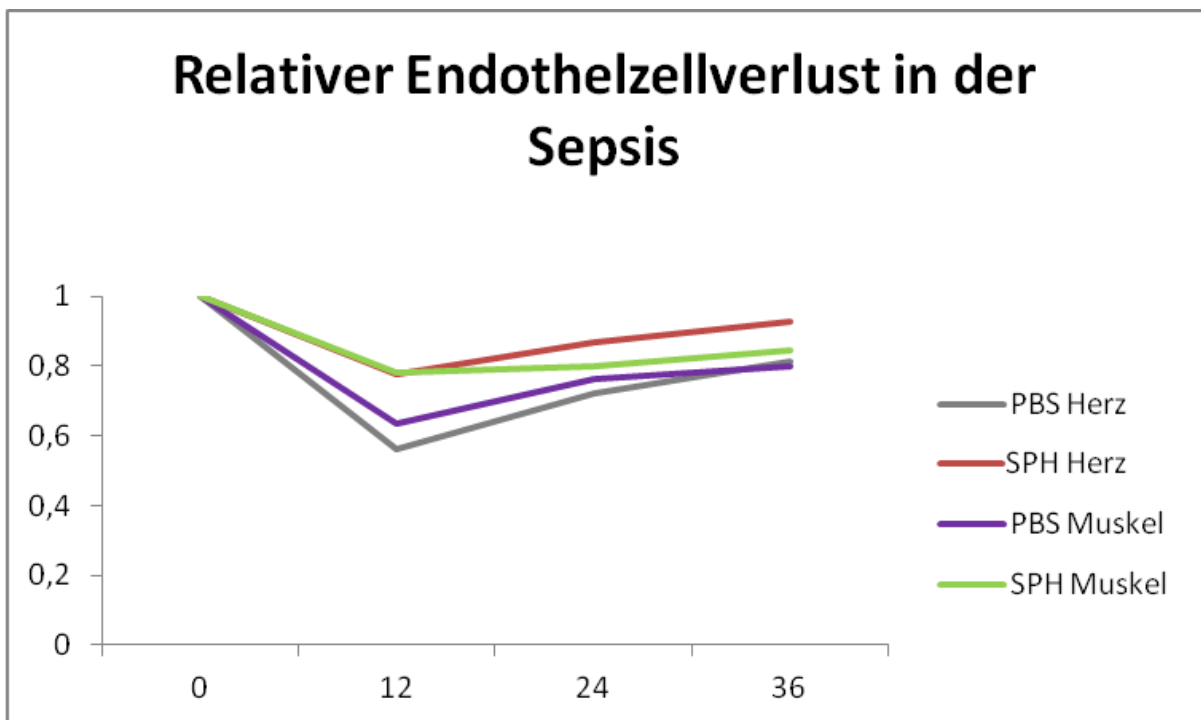


Abbildung 50: Der Endothelzellverlust in der Sepsis kann durch S1P im Herzen und im Muskel reduziert werden (n=4)

### 3.5.4. Die Rolle des PC/EC-Quotient

Wichtig bei der Beurteilung der Schwere des Krankheitsbildes sind nicht nur die absoluten Zahlen, sondern auch die relativen Veränderungen des Verhältnisses zwischen den Perizyten und den Endothelzellen. Die Perizyten-Endothelzellquotienten sind unterschiedlich groß. Er nimmt bei Behandlung von  $0,75 \pm 0,04$  auf  $0,91 \pm 0,04$  zu ( $n=5$  bei p-Wert 0,04). In der Tat nehmen die Endothelzellen in beiden Gruppen schneller ab. Pathophysiologisch wird das Zusammenspiel zwischen beiden Zellarten behindert, je mehr sich dieser Quotient verändert.

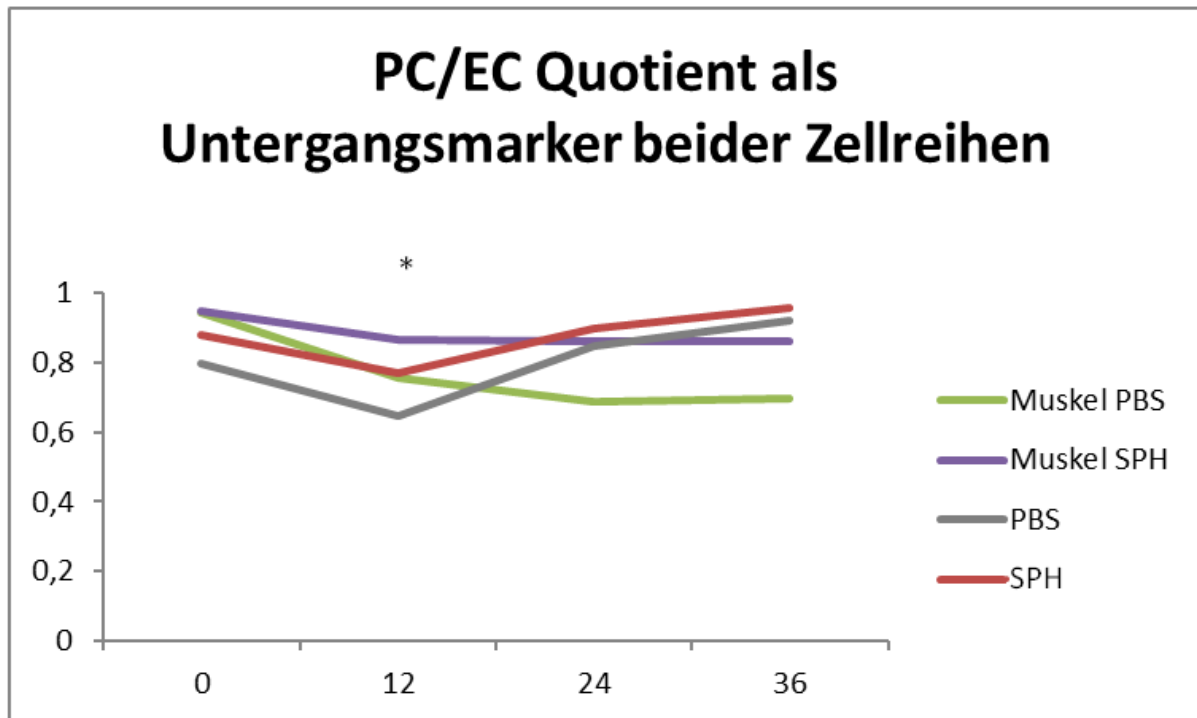


Abbildung 51: Die Höhe des Quotienten zwischen Perizyten und Endothelzellen (PC/EC) und sein Stellenwert für die Integrität des Gefäßes. Bei dem Vergleich der Quotienten in den Muskeln behandelter und unbehandelter Mäuse wird ein Signifikanzniveau unter 0,05 erreicht.

Aufgrund des gleichzeitigen Verlustes von Endothelzellen und Perizyten ist der Begriff vaskuläre Dysfunktion geeigneter als endotheliale Dysfunktion.

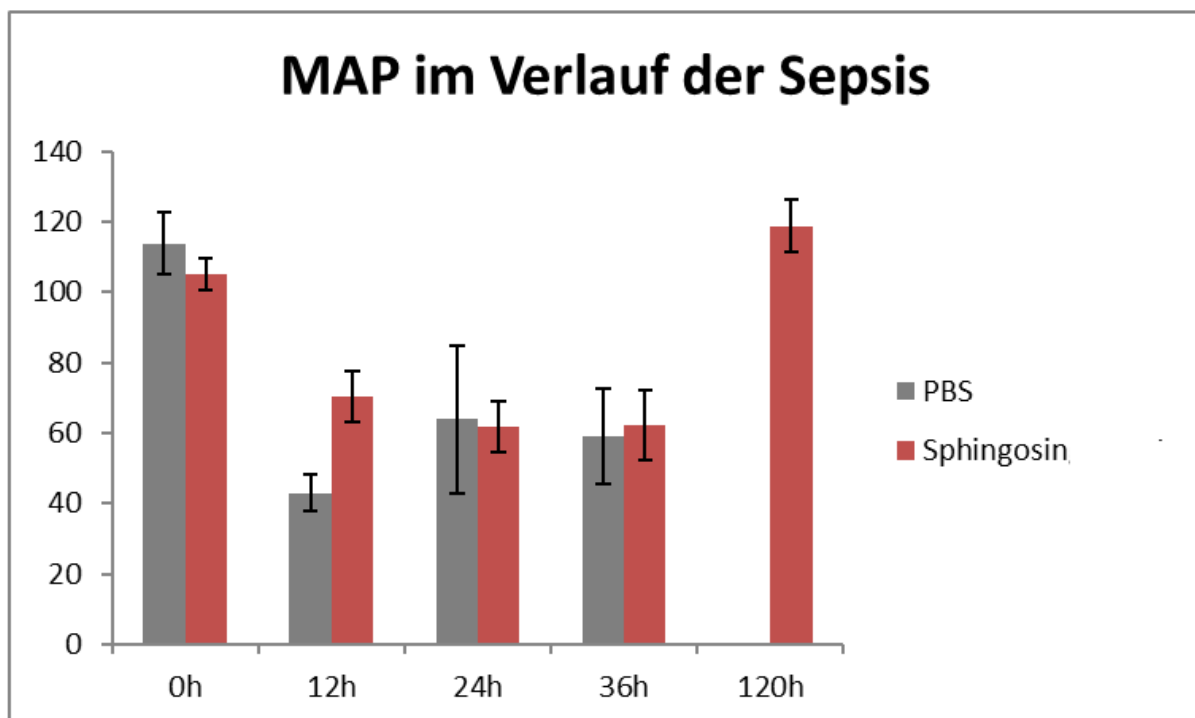
## 3.6. Blutdruck

### 3.6.1. Zeitliche Entwicklung des Blutdrucks

Im Verlauf einer Sepsis verändern sich bei einem Patienten viele Parameter. Im Rahmen des oben genannten SIRS finden unter anderem Veränderungen von Puls und Atemfrequenz statt. Während die Leukozytose bzw. Leukozytopenie und die Hypothermie bzw. Hyperthermie maßgebliche Zeichen der Entzündungsreaktion darstellen, haben Tachykardie und Tachypnoe kreislaufunterstützende Funktionen. Sie sollen einen normalen Blutdruck so lange wie möglich aufrechterhalten, um den Tod

durch die Kreislaufdepression zu verhindern. Das Überleben eines Patienten ist daher maßgeblich davon abhängig, inwiefern der Blutdruck absinkt. In der Tat ist das letzte Stadium der Sepsis, der septische Schock durch einen Abfall des systolischen Blutdruckes auf unter 90 mmHg definiert und geht mit der schlechtesten Prognose einher. Der Regulation des Blutdruckes kommt daher eine fundamentale Rolle zu.

Es wurde durch die vorherigen Versuche gezeigt, dass die Gabe von SPH in der Lage ist zum einen kreislaufunterstützend, endothelprotektiv sowie perizytenprotektiv zu wirken. Zusätzlich ist es in der Lage die Gefäßpermeabilität in der Sepsis herunterzusetzen. Im weiteren Verlauf ist nun zu klären, wie sich all diese positiven Effekte auf den Blutdruck der Mäuse auswirken?



**Abbildung 52: Mittlerer Arterieller Blutdruck in Abhängigkeit der Zeit nach Sepsisbeginn bei PBS oder SPH Gabe**

Um die Veränderungen des Blutdrucks langfristig beobachten zu können und die durch die Sepsis induzierte Hypotonie zu beurteilen, wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) von 13 PBS Mäusen und 10 SPH Mäusen über die Versuchsdauer gemessen. In der vorliegenden Graphik sind diese Blutdruckmittelwerte in mmHg nach der Zeit aufgetragen. Der Ausgangswert ist bei den Kontrollmäusen zu Beginn um fast 10 mmHg höher als der der behandelten Tiere. Ein im t-Test ermittelter p-Wert von 0,15 zeigt, dass es bei Versuchsbeginn keinen signifikanten Blutdruckunterschied in beiden Gruppen gibt. Nach 12 Stunden sinkt der Blutdruck beider Gruppen signifikant ab. Diese Wirkung ist innerhalb der Kontrollgruppe stärker (p-Wert von  $8 \times 10^{-15}$ ) als in der S1P Gruppe (p-Wert von  $1,1 \times 10^{-3}$ ). In der Tat sinkt der mittlere arterielle Druck in der Kontrollgruppe von  $114 \pm 8,8$  mmHg systolisch auf knapp  $43,0 \pm 5,3$  mmHg nach 12 Stunden. Von den dabei 13 getesteten Kontrollmäusen konnte zu diesem Zeitpunkt mit dem gegebenen Coda Blutdrucksystem nur bei zwei Mäusen ein messbarer Blutdruck nachgewiesen werden. Die Blutdrücke waren mit jeweils 52 mmHg und 67 mmHg hypoton und nahe der Messgrenze des Gerätes. Dieses kann Werte unter 40 mmHg nur schwer erkennen (siehe 2.3.1). Hier sind also 85% der Werte aufgrund von schwerer Hypotonie nicht mehr messbar. In der behandelten Gruppe findet dagegen nicht einmal eine Halbierung des MAP

statt, er nimmt um knapp 30 mmHg von  $105 \pm 4,5$  auf  $74 \pm 6,8$  mmHg ab. Insgesamt ist hier bei 3 Mäusen kein Blutdruck mehr messbar. Bei einer Versuchszahl von 10 in dieser Gruppe entspricht dies 30%. Nach 12 Stunden ist der MAP der S1P-Gruppe signifikant ( $p = 2 \cdot 10^{-4}$ ) besser als der MAP der Kontrollgruppe. Dies ändert sich 24 Stunden nach Beginn des Sepsisversuches. Der MAP steigt in der Kontrollgruppe wieder auf  $63,8 \pm 21,1$  mmHg an und liegt damit auf gleicher Höhe wie der der behandelten Gruppe ( $61,7 \pm 7,2$  mmHg).

Nach 36 Stunden sind nur noch 2 Mäuse in der Kontrollgruppe gemessen worden. Zudem sind hohe Standardabweichungen von bis zu 22% des Mittelwertes hinderlich in der Interpretation der Ergebnisse. Bei einer reinen Betrachtung der Mittelwerte, liegen beide Gruppen wie nach 24 Stunden mit 59,0 mmHg bei den Kontrollen und 62,1 mmHg bei den behandelten Mäusen gleichauf.

Im weiteren Verlauf stabilisiert sich der Blutdruck in der behandelten Gruppe wieder langsam, um nach 120 Stunden mit  $118,8 \pm 7,4$  mmHG einen normotonen Blutdruckwert zu erreichen, der höher ist als der Ausgangswert ( $105,0 \pm 4,5$  mmHg). Die Wiederherstellung der Normotonie bei überlebenden Mäusen zeigt, dass eine „Restitutio ad integrum“ bei diesem Modell der Sepsis möglich ist. Wie relevant allerdings die relative Erhöhung des Blutdruckes gegenüber dem Anfangswert ist, kann beantwortet werden, indem retrospektiv die Blutdruckwerte der überlebenden Mäuse analysiert werden.

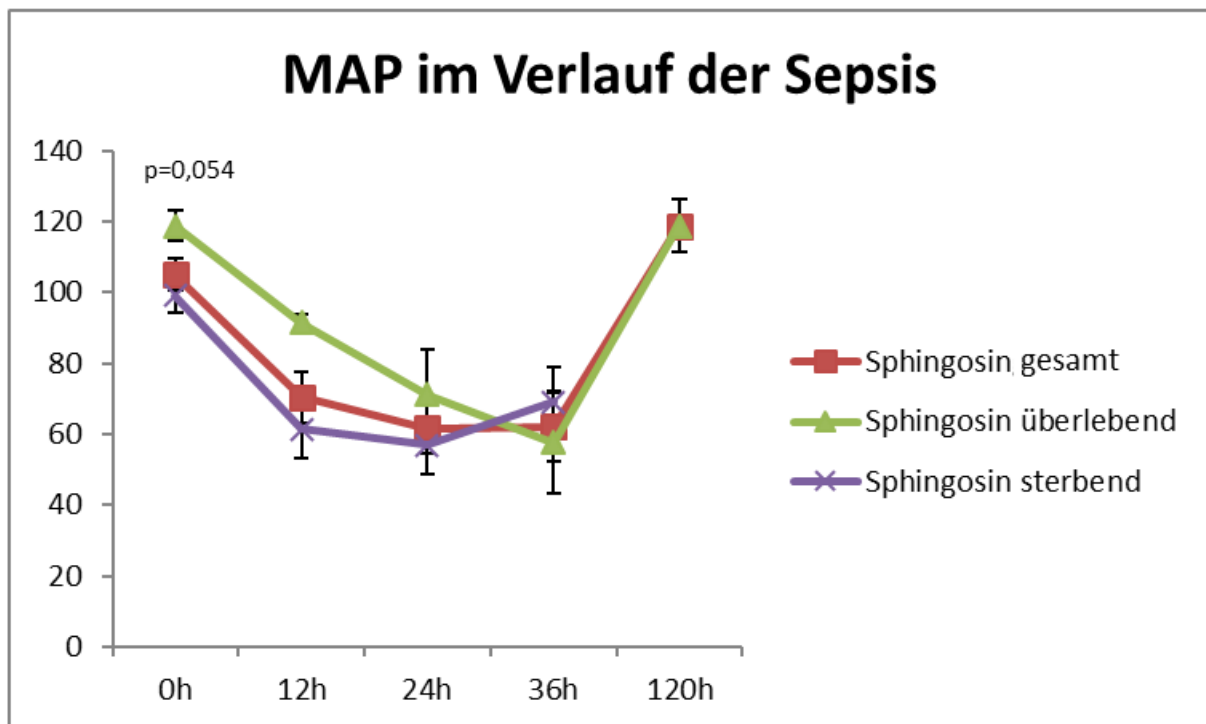


Abbildung 53: MAP bei SPH Mäuse, Überlebende gegen nicht Überlebende

Die Blutdruckwerte der überlebenden Mäuse sollen Aufschluss darüber geben, ob jene Mäuse überlebt haben, die initial einen besseren MAP hatten und wie sich der MAP im Laufe der Sepsis verhält. In der vorliegenden Graphik, wurden die SPH-behandelten Mäuse in zwei Gruppen getrennt: Die in grün gekennzeichneten Überlebenden wurden mit den violett markierten verstorbenen Mäusen auf die Höhe ihres MAP verglichen.

Es fällt auf, dass der MAP der kleineren Gruppe der Überlebenden vor der Sepsis homogen um den Mittelwert von  $118,7 \pm 4,3$  mmHg verteilt ist und praktisch denselben Wert einnimmt wie der Blutdruck der Mäuse nach 120 Stunden Sepsis ( $118,8 \pm 7,4$  mmHg). Dieser MAP ist höher als der durchschnittliche MAP der Mäuse, die im Versuch gestorben sind ( $99,2 \pm 4,7$  mmHg). Der initiale Blutdruck scheint daher eine Größe zu sein, die die Prognose maßgeblich beeinflusst. Der p-Wert von 0,054 bei einer Überlebensgruppe von n=3 Mäusen bestätigt einen recht deutlichen Trend.

Im weiteren Verlauf nimmt der MAP der überlebenden Gruppe alle 12 Stunden um ungefähr 20 mmHg ab. In der Tat liegt er nach 12 Stunden bei  $91,4 \pm 2,4$  mmHg nach 24 Stunden bei  $71$  mmHg  $\pm 12,74$  und erreicht nach 36 Stunden mit  $57,5 \pm 14,3$  mmHg den niedrigsten Wert. Die Mäuse, die während des Versuches versterben, sind erwartungsgemäß zu den Zeitpunkten 12 Stunden mit  $61,45 \pm 8,1$  und 24 Stunden mit  $56,9 \pm 8,1$  mmHg hypotoner. Allerdings übertreffen sie die bis dahin bessere Gruppe nach 36 Stunden. Da die meisten Mäuse dieser Gruppe kurz darauf sterben, lässt sich das vielleicht wie der in der PBS Kontrollgruppe beobachtete Anstieg des Blutdruckes nach 24 Stunden so interpretieren, dass die Mäuse in eine „deregulierte“ Agoniephase eintreten, in der kurz vor dem Tod der Blutdruck erneut steigt.

Unabhängig davon zeigt diese Aufteilung, dass die Mäuse, die diesen Versuch überleben, schon zu Beginn einen etwas höheren Blutdruck aufwiesen, als die verstorbenen Mäuse. Weitere Werte nach mehr als einer Woche wären bei der Frage nach einer anschließenden Hyperkompensation mit Hypertonie oder einem sofortigen Erreichen des initialen Blutdruckes interessant gewesen, konnten aber aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

### 3.7. Überlebenswahrscheinlichkeitskurve

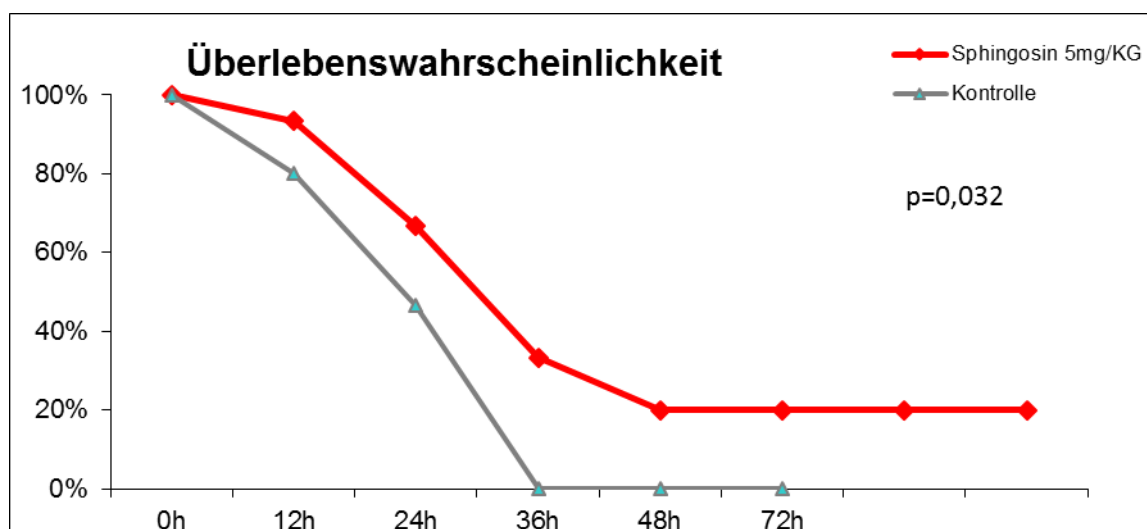


Abbildung 54: Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Zeit nach Sepsisinduktion

Auf der oben abgebildeten Kaplan Meier Graphik ist die Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen nach der Zeit während einer LPS induzierten Sepsis aufgetragen. Die graue Kurve repräsentiert die mit PBS behandelten Kontrollmäuse, die rote Kurve zeigt die Mäuse an, die SPH zu oben genannten Zeitpunkten i.p. bekamen. Während in der Kontrollgruppe nach 36 Stunden alle Versuchstiere tot sind (n=15), überleben in der mit SPH behandelten Gruppe noch rund ein Drittel der Mäuse. Insgesamt sterben von diesen 33% noch 13 Prozentpunkte der Mäuse während des restlichen Versuches,



sodass 20% der mit SPH behandelten Mäuse die Sepsis überleben. Die Zeit, nach der die Hälfte der Mäuse gestorben sind, d.h. die mediane Überlebensdauer ( $t_{1/2}$ ) liegt bei ungefähr 24h für die mit PBS behandelten Tiere und bei knapp 30 h für behandelte Mäuse. Es lässt sich beobachten, dass Mäuse, die den Zeitpunkt 36 h überleben mit einer 75% Wahrscheinlichkeit den gesamten Versuch überleben. Die Letalität der LPS-vermittelten Sepsis wird daher maßgeblich in den ersten Stunden nach ihrem Auftreten bestimmt. Außerdem ist die Gerade, die die Zeitpunkte 0 und 12 h verbindet bereits mit einer Steigung von -1,6%/h steiler nach unten gerichtet als die der SPH-Mäuse mit -0,56%/h. (80% gegen 93% Überlebende nach 12 h). Dies spricht alles dafür, dass SPH die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Sepsis verbessert. Der t-Test, in dem die Überlebenszeit der Mäuse nach Gruppe miteinander verglichen wurde, zeigt mit einem p-Wert von 0,0336 einen signifikanten Unterschied zwischen der mittleren Überlebensdauer der Kontrollmäuse (mittlere Überlebensdauer  $27,2 \pm 2,5$ h) und den behandelten Mäusen (Mittelwert  $49,6 \pm 9,7$ h).

### 3.8. ELISA

Es konnte also gezeigt werden, dass eine prophylaktische Gabe von SPH in der Lage ist, die in der Sepsis entstehenden Schäden zu reduzieren, indem die Funktionsverbesserung unterschiedlicher Organsysteme zu einer Steigerung des systemischen Blutdruckes führt. Um jedoch sicherzugehen, dass es sich bei den Überlebenden nicht um Fehlreaktionen gehandelt hat, und diese tatsächlich eine Sepsis durchliefen, wurde anschließend anhand der Serumproben ein ELISA durchgeführt, um die Konzentration von IL-6 zum Todeszeitpunkt zu bestimmen.

IL-6 Konzentrationen schwanken beim Menschen zwischen 1pg/mL (gesund) bis auf 1 ng/mL (schwerste Entzündung). Bei Mäusen sind Werte bis 30 000 pg/mL möglich. Eine bekannt aseptische Kontrollmaus, die zu Beginn des Versuches mit in die Käfige der anderen gelegt worden war, zeigte IL-6 Spiegel von 296pg/mL und liegt damit unter der beschriebenen Grenze. Im Rahmen einer Sepsis können diese Werte stark ansteigen.

Die ELISA Werte zeigen eine große Spannweite: Die Werte liegen zwischen knapp 4 000 und 400 000 pg/mL. Die SPH-Gruppe hat als durchschnittliche IL-6 Spiegel  $29439 \pm 7492$  pg/mL. Die PBS Gruppe hat einen Durchschnittswert von  $79475 \pm 26608$  pg/mL. Aufgrund der beschriebenen längeren durchschnittlichen Überlebenszeit SPH behandelter Mäuse (siehe 3.7), fließen auch niedrigere „post-septische“ IL6-Werte mit in den Mittelwert dieser Gruppe ein und senken ihn. Die Mittelwerte sind daher nur der Vollständigkeit halber angegeben und dienen nur zur Bestätigung der Sepsis. Keine der zu den Versuchen zugelassenen Mäuse hatte einen Wert unter 500 pg/ml und war damit fehlinjiziert oder aseptisch. Das validiert die vorherigen Ergebnisse. In Abhängigkeit der Zeit lässt sich außerdem eine Veränderung der IL-6 Spiegel feststellen. Diese beschreibt die Entwicklung der Entzündung. Daher wurden die IL-6 Konzentrationen in der Abbildung 28 nach dem Abnahmezeitpunkt aufgetragen. Durch logistische Regression wurde eine Kurve berechnet, die die Abhängigkeit des ELISA-Wertes nach der Zeit modelliert. (siehe 3.8.1.)

### 3.8.1. IL-6 Konzentration als Funktion der Zeit

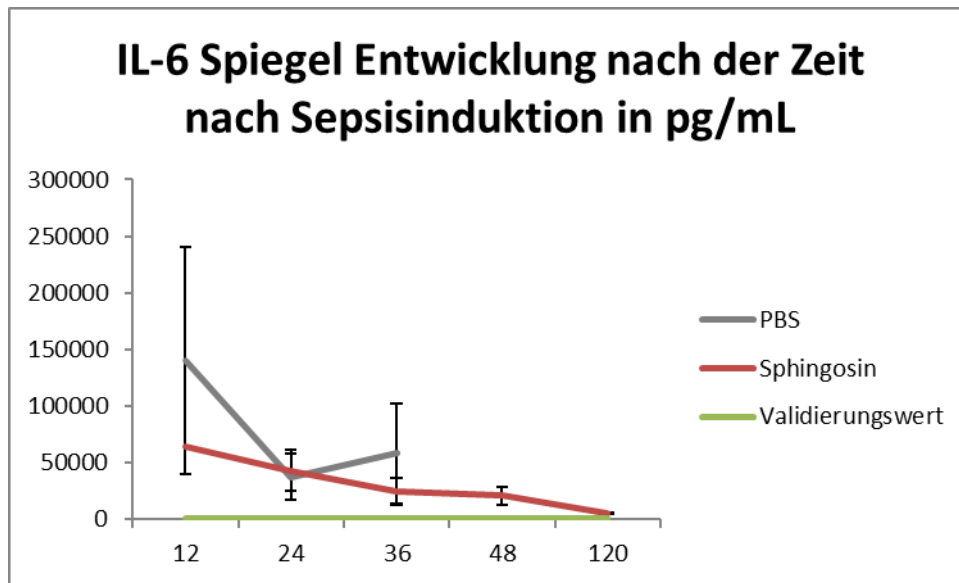


Abbildung 55: IL-6 Spiegel im zeitlichen Verlauf

Als Entzündungsmarker sollte die Höhe des IL-6 Wertes mit dem Überleben korrelieren. Dies ist hier aber nur bedingt der Fall. Wenn man die IL-6 Werte der Mäuse nach dem Todeszeitpunkt vergleicht, fällt nämlich auf, dass für die PBS-Kontrollgruppe der IL-6-Mittelwert der Mäuse, die nach 12 Stunden gestorben sind bei 140169 pg/mL liegt (n=3) und dieser Wert bei den Mäusen, die nach 24 Stunden beendet wurden bis auf 37333 pg/mL (n=5) absinkt. Die Mäuse, die nach 36 Stunden beendet wurden, bzw. gestorben sind, hatten IL-6-Mittelwerte von 58208 (n=7).

Im Vergleich dazu beobachtet man bei der SPH Gruppe, dass der Wert initial mit rund 64000 pg/mL mehr als halb so groß ist wie der Mittelwert bei PBS behandelten Mäuse, die nach 12 Stunden beendet wurden (dieser Wert ist allerdings der Mittelwert einer einzigen Maus; n=1). Ab 24 Stunden (ungefähr 43000 pg/mL) zeichnet sich eine Abnahme der IL-6 Konzentrationen ab, diese liegt nach 36 Stunden bei rund 25000 pg/mL und fällt über den Rest der Versuchsdauer auf ungefähr 20000 pg/mL nach 48 Stunden und nach 120 Stunden, am Ende des Versuches auf  $5547 \pm 435$  pg/mL. Um den Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und der IL-6 Konzentration im Mausserum zu beschreiben, haben wir uns des Statistikprogramms „Regressi“ bedient. Dieses erlaubt es die Konzentration in pg/mL als Funktion der Zeit in Stunden darzustellen ( $f(t) = c$ ) und schlägt verschiedene Annäherungsmodelle vor. In diesem Falle kamen folgende Funktionen in Frage:

$$f(t) = 296 + 88330 * e^{\frac{-t}{33.4}}$$

und  $g(t) = 114109 - 22636 * \ln(x)$

Aufgrund des höheren Korrelationskoeffizienten, beschreibt die Funktion  $f$  diesen Zusammenhang besser. Allerdings handelt es sich hier um eine geglättete Funktion. Dabei sind die IL-6 Konzentration

SPH behandelte Tiere  $f(t)$  in pg/mL und die Zeit in Stunden angegeben. Um eine gleiche Charakterisierung der Kontrollmäuse vornehmen zu können, müssten diese länger überleben.

## 3.9. Pilotexperimente

### 3.9.1. Glatte Muskelzellfärbung

Neben der direkten chronotropen Wirkung des SPH Derivates S1P am Herzen ist am ehesten die Wirkung an den Endothelzellen und Perizyten maßgeblich an der Prognoseverbesserung beteiligt. Um noch auf die dritte große Gruppe von Gefäßzellen einzugehen, wurde angefangen Herz und Muskelgewebe auf glatte Gefäßmuskelzellen zu testen um deren Veränderungen zu beschreiben. (Ein entsprechendes Foto findet sich in Kapitel 2, ein Protokoll im Anhang)

### 3.9.2. Messung der FDG Aktivität in verschiedenen Leukozytenpopulationen nach MACS

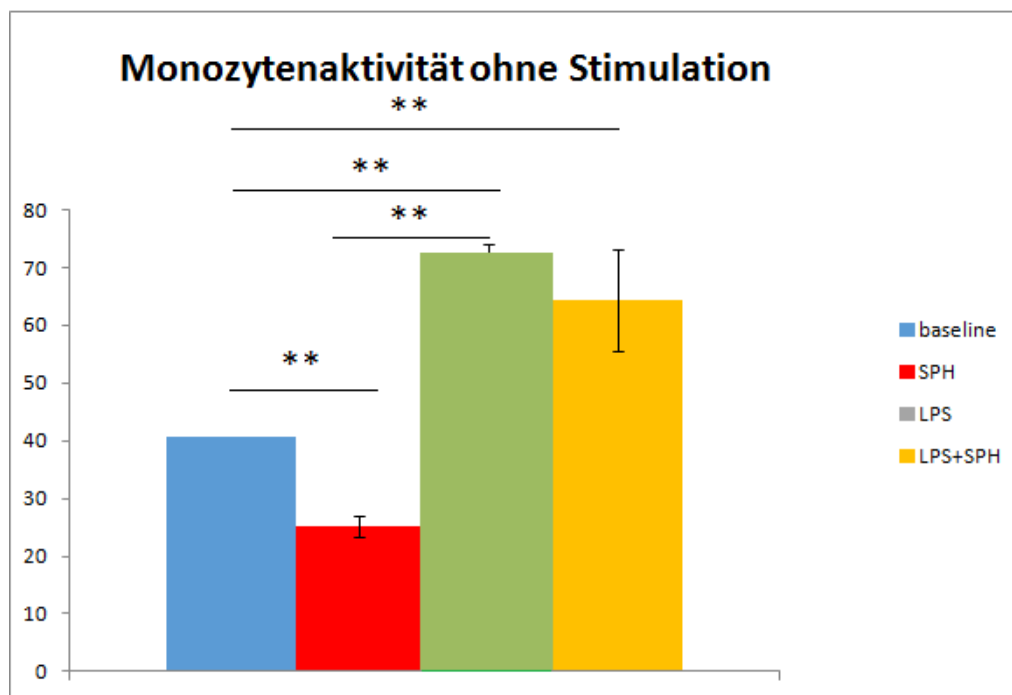
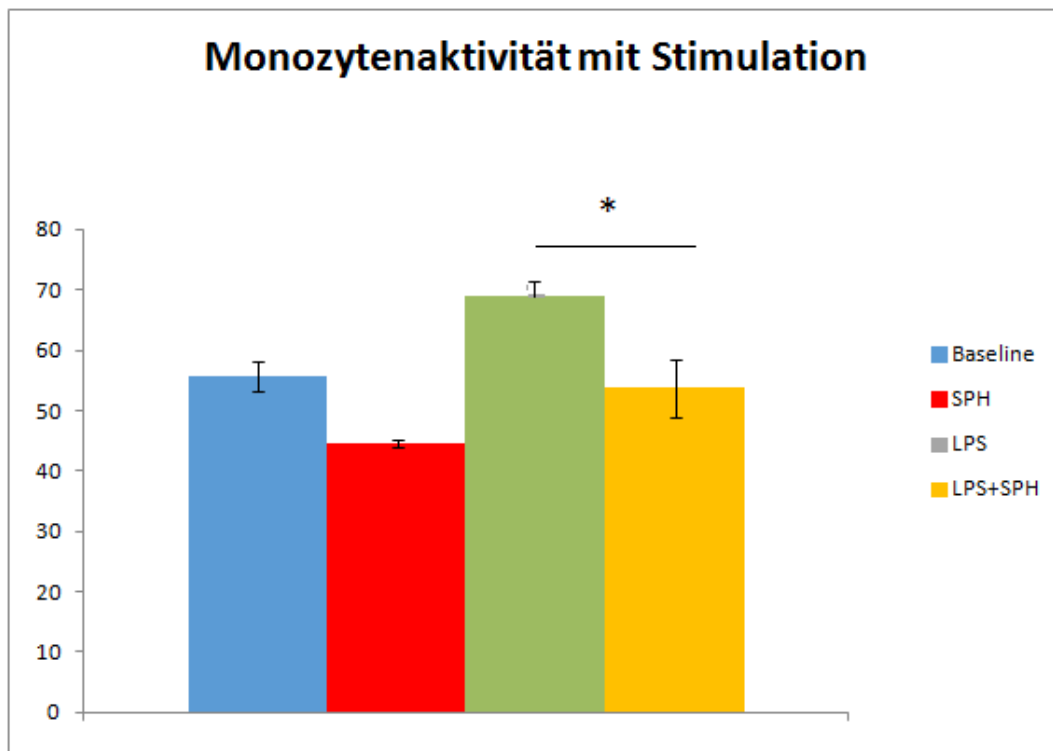


Abbildung 56: FDG-Monozytenaktivität unter verschiedenen Substanzen, ohne Interleukin/TNF- $\alpha$  Stimulation (n=3)

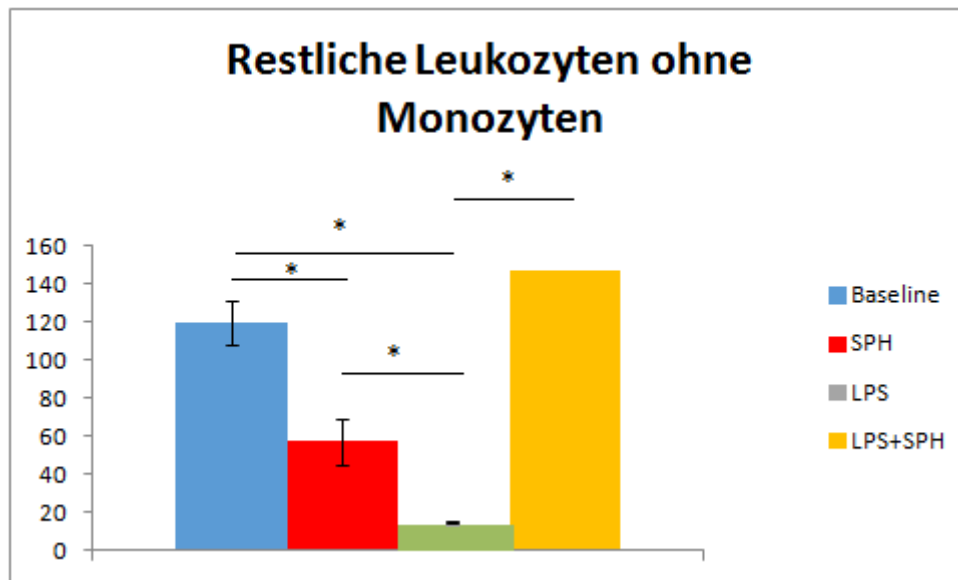


**Abbildung 57: FDG-Monozytenaktivität unter verschiedenen Substanzen, mit Interleukin/TNF- $\alpha$  Stimulation (n=3)**

Die Graphik stellt den Quotienten der FDG-Aktivität einer Zellpopulation (in Becquerel) und der Aktivität einer Standardlösung (ebenfalls in Becquerel) normiert auf die Proteinkonzentration der Probe (in mg) dar. Er wird in daher in  $\text{mg}^{-1}$  angegeben. Dieser Aktivitätsquotient spiegelt die Aufnahme von FDG in der Zelle wider. Ein hoher Wert steht also für eine erhöhte Glucoseaufnahme und damit für eine hohe Zellaktivität. Initial liegt der Monozytenaktivitätsquotient bei  $39,4 \text{ mg}^{-1}$ . Er sinkt ungefähr um ein Drittel auf  $25,2 \text{ mg}^{-1}$  bei SPH Gabe und verdoppelt sich beinahe bei LPS Gabe auf  $72,1 \text{ mg}^{-1}$ . Die zusätzliche Gabe von SPH senkt den Wert von  $72 \text{ mg}^{-1}$  um ein Neuntel auf ungefähr  $64 \text{ mg}^{-1}$ . Die Graphik vergegenwärtigt, dass die von Monozyten ausgehende Aktivität durch die Gabe von SPH vermindert und die Gabe von LPS erhöht werden kann. Gibt man beide Substanzen zusammen, überwiegt der aktivierende Effekt. Die LPS Wirkung lässt sich nur partiell durch SPH abschwächen.

Zusätzlich wurde untersucht wie ein Mediatorencocktail aus IL-4, IL-10 und TNF- $\alpha$  sich auf die Vorergebnisse auswirkt. Hier überwiegt die TNF- $\alpha$  Wirkung, da die Baselineaktivität um etwa ein Drittel steigt. Es wird auch eine Erhöhung der Aktivitäten in der zweiten und letzten Säule bemerkbar, während die Dritte stagniert. Dies lässt sich so interpretieren, dass sich die Monozytenaktivität wahrscheinlich bei ungefähr  $70 \text{ mg}^{-1}$  ihr Maximum findet und sich auch mit kombinierten LPS und TNF- $\alpha$  nicht mehr steigern lässt.

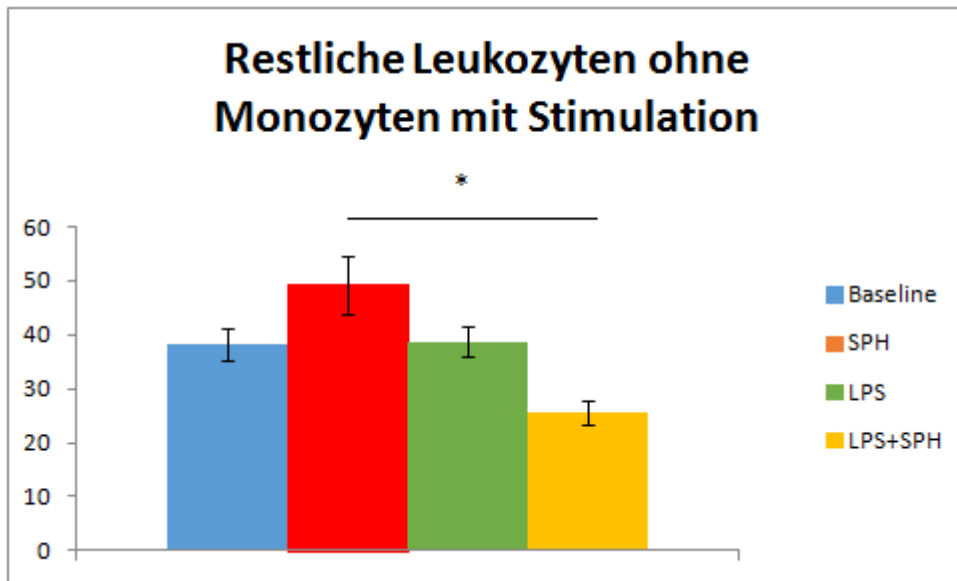
Die anderen Ergebnisse stützen diese Theorie, da bei allen anderen Gruppen die Monozytenaktivität durch die Interleukine gesteigert wird. Während der Aktivitätsquotient des Baselinewertes von 39,4 auf 55,8  $\text{mg}^{-1}$  Protein steigt und des SPH Quotient sich bei Stimulation mit dem Sprung von 25,2 auf 44,5  $\text{mg}^{-1}$  beinahe verdoppelt, ist ein Ceiling Effekt bei den LPS Gruppen zu erkennen. Nur in der kombinierten LPS/SPH Gruppe sinkt der Wert von 64,3 auf 53,7  $\text{mg}^{-1}$ .



**Abbildung 58: FDG Aktivität der Leukozyten ohne Monozyten unter Stimulation mit verschiedenen Substanzen, ohne Interleukin/TNF- $\alpha$  Stimulation (n=3)**

Die gleichen Untersuchung wurden an der restlichen Leukozytenpopulation durchgeführt. Mit einem Ausgangswert von 120  $\text{mg}^{-1}$  hat die Leukozytenaktivität zwar noch die gleiche Größenordnung wie die der reinen Makrophagenkultur, ist aber dreimal höher. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die inhomogene Leukozytenkultur auch für inhibitorische Effekte Energie verbraucht. Die Monozyten tun dies vor allem nach Aktivierung. Auch hier wirkt das SPH aktivitätssenkend. Bei SPH-Gabe wird die Aktivität halbiert. Dies kann eine anti-inflammatorische Wirkung oder der Mangel der chemotaktischen Wirkung des SPH, dass aufgrund des mangelnden Inflammationsreizes nicht zum migrationsfördernden S1P verstoffwechselt wird. Im Vergleich zu den Monozyten scheint das LPS bei den restlichen Leukozyten allerdings den gegenteiligen Effekt zu bewirken. Die Aktivität wird hierbei auf ein Zehntel supprimiert.

Schwerer zu erklären ist die kombinierte Wirkung beider Substanzen. Anders als erwartet führt sie zu einer leichten Erhöhung der Aktivität. Eine mögliche Erklärung ist der verstärkte SPH-Turnover durch Induktion der SPH- Kinase.



**Abbildung 59: FDG-Aktivität der Leukozyten ohne Monozyten unter Stimulation mit verschiedenen Substanzen, mit Interleukin/TNF- $\alpha$  Stimulation**

Zuerst einmal lässt sich grob überblickend sagen, dass die mit der Interleukinmischung stimulierten Zellen sich umgekehrt zu den nicht stimulierten Zellen verhalten. Abgesehen von der LPS Gruppe fallen die Aktivitätswerte.

Die Baseline fällt beispielsweise von 119 auf 38 mg<sup>-1</sup>. Die Stimulation vermindert daher die Leukozytenaktivität. Dieser Effekt lässt sich auch bei anderen Gruppen beobachten. Die SPH behandelten Zellen zeigen zwar eine um etwa ein Drittel erhöhte Aktivität gegenüber der Baseline (diese nimmt von 38,1 mg<sup>-1</sup> auf 49,2 mg<sup>-1</sup>) zu, im Vergleich zu nicht stimulierten Werten ist aber auch hier der Wert niedriger. Bei der LPS Gruppe scheint die Aktivität ähnlich hoch zu sein wie die der Baseline mit Interleukinen. Das LPS senkt hier die Aktivität nicht zusätzlich. Die beinahe supprimierte Aktivität verdreifacht sich von 12,3 auf 38,6 mg<sup>-1</sup>. Warum die Kombination von Stimulation, LPS und SPH die Werte allerdings sinken lässt, konnte nicht völlig geklärt werden. Möglich wäre eine Suppression der Aktivität regulatorischer Lymphozyten oder einer anderen lymphozytären Subpopulation durch das TNF- $\alpha$ .

Das Ziel dieser Versuche war eine Skizzierung verschiedener Angriffspunkte der Beeinflussung der kardiovaskulären Dysfunktion in der Sepsis durch SPH und S1P. Das MACS soll dabei zusätzlich zu den kardiovaskulären „Targets“ eventuelle immunmodulatorische Angriffspunkte offenbaren. Aufgrund des wachsenden Interesses in der Forschung und der vielen beschriebenen Funktionen, konnte nicht auf alle Ansätze eingegangen werden, die in der Literatur bereits veröffentlicht sind.

Im folgenden Teil werden zunächst die beschriebenen Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert, dann wird auf eventuelle Fehler und Confounder eingegangen, anschließend werden die nächsten möglichen Experimente besprochen.

# 4. Diskussion: Zusammenfassung, abschließende Wertung und Ausblick

## 4.1. Zusammenfassung

Die Sepsis ist ein kompliziertes Krankheitsbild, das alle Organe des Körpers betrifft und dessen Pathomechanismen nicht vollständig verstanden sind. Es sind bereits viele potentielle Angriffspunkte beschrieben worden, dennoch konnte keiner den bahnbrechenden Erfolg erbringen, der nötig wäre, um der hohen Letalität dieser Erkrankung entgegenzuwirken. Mit dem SOFA-Score wird versucht, die Definition an die klinischen Gegebenheiten der Sepsis anzupassen. Nicht allein aufgrund der finanziellen und sozialen Tragödien bleibt die rasche Beherrschung sowohl der kardiovaskulären als auch der immunologischen Entgleisungen der Sepsis immer noch ein ernstzunehmendes Thema.

Das Ziel dieser Arbeit war vorrangig zu ermitteln, ob sich der kardiovaskuläre Schaden, der bei einer Sepsis entsteht mit dem Sphingolipid SPH und seinem Derivat S1P reduzieren lässt. Dabei wurde als Annäherung das Modell der LPS-induzierten Sepsis gewählt. Mit einer Versuchsgruppe von 30 Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanz den Perizyten und Endothelzellverlust langfristig reduzieren kann und dabei ein physiologisches Gleichgewicht zwischen beiden Zelltypen aufrechterhalten wird. Dieses Verhältnis führt zu mehr endothelialer Stabilität. Dies führt zu einer geringeren Extravasation von Flüssigkeit ins Gewebe, damit zu einem dauerhaft höheren Perfusionsdruck (MAP) in den peripheren Geweben und verzögert die kardiale Erschöpfung. Diese pathophysiologischen Korrelate spiegeln sich anschließend in einer signifikant höheren Überlebenswahrscheinlichkeit wider.

Für diese Arbeit waren mehrere SPH/S1P Wirkungen wesentlich. Wir haben uns zunutze gemacht, dass die Gabe von SPH oder LPS (oder anderer inflammatorische Reize) unabhängig voneinander die SPH-Kinase aktiviert und das ideale SPH/S1P Verhältnis reguliert. Durch den hämatologischen Zelluntergang in der Sepsis kann diese Substanz nicht mehr ausreichend zur Verfügung gestellt werden, da der Hauptspeicherort Erythrozyten und Thrombozyten sind. Zusätzlich wichtig war für uns, dass S1P die Apoptose verhindert und die Migration von Zellen fördert. Dies sind Effekte, die wir nicht selbst in der Zellkultur nachgewiesen haben, die aber für das endotheliale Gleichgewicht und die mikrovaskuläre Integrität nicht zu vernachlässigen sind. Das größere intravasale Blutvolumen, verzögert eine Zentralisierung, das Shuntvolumen nimmt ab und der Blutdruck steigt. Letztendlich kompensiert die Sinustachykardie den massiven septischen Inotropieverlust bei sinkendem peripherem Widerstand teilweise.

Dennoch handelt es sich auch hier um ein Modell dieser Erkrankung. Es existieren zum einen andere Möglichkeiten eine Sepsis im Labor auszulösen und auch der Score muss nicht immer die physiologischen Gegebenheiten der Maus, d.h. das Überleben 1:1 widerspiegeln. Neben den gerade präsentierten Ergebnissen und Einwänden werden noch weitere Kritikpunkte in diesem Kapitel diskutiert.

### 4.1.1. Methoden im Mausmodell

Zunächst handelt es sich bei dem Modell um ein Sepsismodell bei der Maus. Diese hat andere physiologische Gegebenheiten als der Mensch. Das Herz ist kleiner, die Herzfrequenz ist um ein vielfaches höher und die Inflammationsreaktion kann schwächer ausfallen. Ein Schwein käme der Herzanatomie und Physiologie der Menschen näher. Dennoch bietet die Spezies Maus viele Vorteile. Mäuse sind leicht in der Handhabung, klein und ohne großen Aufwand zu halten. Man kann relativ schnell hohe Fallzahlen erreichen und die Sepsis schneller induzieren. Die benötigte Beobachtungszeitspanne ist kürzer, denn die Sepsis endet auch schneller als beim Menschen. In unserer Versuchsreihe ist das IL-6 als Bestätigung verwendet worden, dass überhaupt eine Sepsis stattgefunden hat. Die Spiegel werden nicht für fundiertere Aussagen verwendet. Des Weiteren wird die LPS-Gabe von einigen Autoren eher als Endotoxämie und nicht als „echte“ Sepsis bezeichnet. Es folgt eine Skizzierung der verschiedenen Möglichkeiten eine Sepsis im Labor auszulösen.

#### 4.1.1.1. Vor und Nachteile anderer Labormethoden in der Pathogenese einer Laborsepsis

Es ist offensichtlich, dass jede Sepsis aufgrund der Höhe der Bakteriämie, der Virulenz und der Genetik des Patienten und aller anderen Umweltfaktoren unterschiedlich ist. Es ist genauso offensichtlich, dass sehr gefährliche wie z.B. Meningokokken nicht ohne weiteres für die Sepsisforschung verwendet werden können. Die Forschung braucht daher einen Kompromiss um ein Modell zu kreieren, das auf der einen Seite leicht durchführbar und reproduzierbar ist, eine passende Annäherung an das Krankheitsbild gewährleistet und das forschende Personal nicht übermäßig gefährdet. In diesem Kontext haben mehrere Sepsismodelle Einzug in das Labor gefunden, von denen sich vor allem das LPS und das CLP-Modell durchgesetzt haben.

Bei der CLP (caecal ligation and puncture) wird durch eine kleine Operation in Narkose die Appendix der Maus aufgesucht, abgeschnürt und mit einer Kanüle punktiert. Dies führt zu einer sehr starken Peritonitis durch Darminhalt. Vorteilhaft ist dabei, dass echte Bakterien sich in der Darmwand befinden und die Entzündung unterhalten. Die stärkste Ausprägung der Erkrankung gipfelt bei diesem Modell relativ spät, da erst genug Darminhalt in das Peritoneum fließen muss. Es entspricht aber beim Menschen dem physiologischen Modell einer unbehandelten (Messer-) Stichverletzung ohne Gefäßbeteiligung. Nachteile an diesem Modell sind die Operation mit Narkose, die kardiodepressiv ist und vor allem die Operation selbst, bei der nicht immer am selben Ort bei selber Darmfüllung und selber Darminhalt stattfindet. Außerdem wird die Peritonitis nicht wieder versorgt, sondern die Punktionslöcher bleiben offen. Die CLP ist leicht durchführbar und bietet eine gute Annäherung an das Krankheitsbild. Dennoch ist das Krankheitsbild selbst bei erfahrenen Operateuren meist sehr unterschiedlich ausgeprägt und verschlechtert sich kontinuierlich. Die Maxime „ubi pus ibi evaqua“, die als Fokussanierung in jedem Therapiekonzept vertreten ist, findet hier keine Beachtung, sodass potentiell wirksame Therapeutika im kontinuierlich steigenden Zytokinsturm oder aufgrund der operativen Variabilität untergehen können.

Wenig verwendete Modelle sind die CASP (Colon ascendens stent peritonitis) und die Fäkalinjektion (FI). Das CASP Modell ähnelt als chirurgisches Verfahren mit Narkose der CLP, hier wird eine Passage zwischen Colon ascendens und Peritoneum durch einen Stent kreiert. Dieses Modell hat den Nachteil nach 48 Stunden eine Mortalität nahe 100% zu haben. Auch in diesem Modell findet die Fokussanierung nicht statt.



Bei der FI wird ein in Fibrin ummantelter Pellet injiziert, der eine Mischung grampositiver und gramnegativer Keime enthält. So wird eine Sepsis ausgelöst.

Die Injektion von LPS hat Vor- und Nachteile gegenüber den gerade genannten Methoden. Der größte Nachteil ist, dass keine Bakterien injiziert werden, sondern nur ihre Antigene vor allem gramnegativer Bakterien verwendet werden. Zum einen muss aufgrund der stereotypischen Antwort des Organismus auf Entzündung nicht immer eine gemischte Sepsis vorliegen, damit sie analysiert werden kann. Zum anderen bieten auch die anderen Methoden keine Möglichkeit zur Analyse einer durch andere Mikroorganismen ausgelösten Sepsis.

Die LPS-Methode bietet auch einige Vorteile. Sie kann helfen das komplexe Gesamtbild einer Sepsis durch gezielte Analyse der „isolierten Endotoxinämie“ zu verstehen. Bei dieser Methode kann gewichtsadaptiert immer dieselbe Dosis appliziert werden. Sie ist die einzige Methode, bei der eine „Fokussanierung“ von alleine stattfindet, da im Peritoneum keine Bakterien mehr proliferieren. Die Belastung nimmt mit der Zeit ab, sodass man beobachten kann ob therapeutische Maßnahmen greifen können. Während bei den anderen Modellen der Schock später beginnt und protrahiert ist, beginnt im LPS Modell die Schocksymptomatik früher, es werden höhere Zytokinspiegel erreicht. Sie erlaubt daher höhere Schlagzahlen in kürzeren Abständen.<sup>143</sup>

Im Bezug auf diese Arbeit wäre eine andere aggressivere Methode wie z.B. die CLP oder vor allem die CASP, bei der alle Mäuse binnen 48 Stunden versterben, nicht aussagekräftig gewesen, da die erläuterten Methoden von anderer Arbeitsgruppen außerhalb von Deutschland und damit ohne Beachtung des hiesigen geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt worden sind. Aufgrund des protektiven Scorings wäre bei einer Durchführung einer solchen CASP hierzulande sogar mit noch kürzeren Überlebenszeiten zu rechnen.

Die Sepsis ist eine Erkrankung, die bei adäquater intensivmedizinischer Betreuung einen längeren Krankheitsverlauf zeigt, als diese Modelle suggerieren. Die Ergänzung der Therapiesäulen dieser Erkrankung benötigt eine Substanz, die langfristig das Immunsystem und das Herzkreislaufsystem beeinflusst. Es gestaltet sich schwer einen solchen Wirkstoff in einem Modell zu validieren, bei dem die Mäuse tot sind, bevor das Wirkmaximum erreicht ist. Die Operationen sind so ausgelegt, dass die Peritonitis irreversibel und progredient ist. Die Reaktion des Organismus auf diesen Zustand ist daher viel stärker, als die in einer normalen Sepsis. Bei Modellen wie der CASP neigen Untersucher dazu aufgrund der stark reduzierten Lebenserwartung Unterschiede in Versuchsgruppen zu unterschätzen. Ein Beleg für die Schwere der Sepsis und die komplizierte Reproduzierbarkeit bieten Singleton *et al.* Er bestätigt im Jahre 2003, dass die Reaktion bei der CLP-induzierten Sepsis viel stärker ist und die Inflamationsparameter mit der Länge des abgebundenen Zäkumabschnitt zunimmt.<sup>73</sup> Kleine Unterschiede in der Operationstechnik haben daher große Auswirkungen auf die Ergebnisse.

#### 4.1.1.2. Objektivität des Scores

Der Score ist ein zentrales Element in der Durchführung dieser Versuche. Er stellt die Grundlage für das Beenden der Mäuse und hat damit einen großen Einfluss auf die Überlebenskurve. Der Gewichtsverlust ist als Intervallskala ein objektiver Parameter. Die Verhaltensänderung dagegen folgt zwar auch objektivierbaren Kriterien, unterliegt aber dennoch einer gewissen Subjektivität des Untersuchers.

Die Verhaltenspunkte werden durch die Beobachtung der Mäuse im Käfig vergeben (läuft normal/eingeschränktes Putzverhalten/apathische Maus). Auch diese Punktevergabe folgt also einem System. Ein Einwand ist allerdings, dass beim Menschen trotz Schmerzen und Stresses alle Therapieoptionen ausgeschöpft werden, wogegen in diesem Modell der Versuch je nachdem beendet wird „wie krank sich die Maus fühlt“. Dadurch würden die Überlebenszahlen reduziert. Tatsächlich liegt die applizierte Dosis von 20 mg/kgKG nur leicht unter der LD<sub>50</sub>. Das bedeutet, dass ohne das Tierschutzgesetz, wahrscheinlich 50% der Kontrollmäuse im Verlauf des Versuches sterben würden und nicht alle. Möglicherweise würden auch mehr behandelte Mäuse überleben.

#### *4.1.1.3 Sensitivität des Scores*

Diese Methode zum Erfassen des Gesundheitszustandes der Maus lässt sich trotz gewisser Schwächen dennoch durch einen t-Test innerhalb der Kontrollgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten validieren. Vergleicht man die Score Werte zu den Zeitpunkten 12, 24 und 36 h untereinander oder mit dem Ausgangswerten, ist der Unterschied signifikant und damit die Sepsis und der Krankheitszustand progredient. Der Schmerz ist ein seltener erhobener Parameter, der durch den Versuchsaufbau zusätzlich beeinflusst wird. Den Mäusen wird zu jedem Zeitpunkt Buprenorphin (Temgesic®) verabreicht, was ein langwirksamer Partialagonist am Opioidrezeptor darstellt. Dies wird im Sinne der Schmerzprävention durchgeführt. Dennoch können Mäuse ziemlich selten durch die Sepsis Schmerzsymptome entwickeln, die dann ebenfalls nach Schwere mit 5 bis 20 Punkten bewertet werden können. Aszites und Dyspnoe treten bei der Sepsis ebenfalls auf. Allerdings sind dies eher Spätmanifestationen der Sepsis und die meisten Mäuse erreichen einen Score von 20 oder mehr bevor Aszites und Dyspnoe physiologisch wirksam werden.

#### *4.1.1.4. Beeinflussung der anderen Ergebnisse durch den Score*

Durch den Score findet ein Censoring der Mäuse statt. Da tote Mäuse ab dem Zeitpunkt ihres Ablebens nicht mehr in spätere Erhebungen von Blutdruck oder Score berücksichtigt werden, bleiben vor allem in der Kontrollgruppe nur noch die Mäuse übrig, die „gesünder“ sind. Diese werden dann zum Teil mit den gesünderen aber auch den kränkeren (durch die Therapie noch nicht verstorbenen) Mäuse der behandelten Gruppe verglichen. Da die Therapie die Überlebenszeit von kränkeren Mäusen verlängert, senken diese die Durchschnittswerte (wie z.B. den Blutdruck). Wenn man die Werte der Überlebenden der Kontrollgruppe (die die gesünderen ihrer Gruppe sind) nur mit den besten Werten der behandelten Mäuse vergleicht, kann man den Unterschied zwischen beiden Gruppen wahrscheinlich vergrößern. Beispielsweise sind nach 36 Stunden nur 2 Kontrollmäuse am Leben und der durchschnittliche Blutdruck beträgt  $59 \pm 13,4$  mmHg. Bei der SPH-Gruppe liegt der Wert bei  $62,1 \pm 9,8$  mmHg. Die zwei Besten der SPH-Gruppe haben aber einen Durchschnittsblutdruck von  $87,8 \pm 3,4$  mmHg. Errechnet man den dazugehörigen p-Wert mit einem t-Test, sinkt dieser von 0,87 auf 0,28 mit 2 Mäusen in jeder Gruppe. Diese Umstände zeigen, dass man mit dem Score aus Tierschutzgründen die Wirkung der Substanz unterschätzt. (Auf diesen Effekt wird im Kapitel 4.2.4 eingegangen.)

Ebenfalls lassen sich mit der Scoringmethode Veränderungen schwer erklären, die nach der Sepsis auftreten. Nach der Sepsis reagieren überlebende Mäuse mit einer Gewichtszunahme, die das Ausgangsgewicht übertrifft. Interessant wären hier weitere Kontrollen gewesen, um zu wissen, ob es sich dabei um eine vorübergehende Veränderung als eine Reaktion auf den septischen Zustand oder um eine bisher unbekannte Nebenwirkung des S1P handelt. An diesem Zeitpunkt sind aber keine Kontrollmäuse mehr am Leben.

## 4.2. Methoden und Ergebnisse

Das für die Gasnarkose verwendete Isofluran hat den Vorteil, dass es weniger kardiodepressiv als Injektionsnarkotika wirkt, dabei dennoch einen Stresstest darstellt. Um eine Gasnarkose mit Neutralität auf das Herz-Kreislaufsystem durchzuführen hätte Sevofluran verwendet werden können. Die Fragestellung war aber die kardiale Kapazität nach 12 Stunden zwischen Kontrollen und behandelten Tieren zu vergleichen. Zu diesem Zweck war es notwendig den bereits insuffizienten Kreislauf noch zusätzlich zu dekomensieren.

Die Echokardiographie offenbart eine globale Herzfunktionseinschränkung während der Sepsis. Sowohl Inotropie als auch Herzzeitvolumen nehmen auf die Dauer deutlich ab. Nach Erschöpfung der kompensatorischen Mechanismen, wie die Steigerung von Herzfrequenz, Atemfrequenz und die Zentralisierung des Blutkreislaufsystems, ist es den Tieren nicht mehr möglich dem abfallenden Blutdruck entgegenzuwirken. Sie fallen in den septischen Schock. Mit Hilfe des auf dem Sonographietisch liegenden EKG, wurde die bereits beschriebene positiv chronotrope Wirkung des S1P erneut nachgewiesen. Durch die etwas längere Halbwertszeit als zum Beispiel Adrenalin scheint das SPH/S1P-System eher wie ein tachykarder Schrittmacher zu funktionieren. Der Puls wird dadurch dauerhaft auf leicht tachykarde Werte gehalten und das Herzzeitvolumen verbessert. Der Schockzustand wird verzögert. Die in dieser Versuchsreihe gemessene Inotropiesteigerung ist höchstwahrscheinlich nicht stark genug ausgeprägt, um die verschiedenen Überlebenswahrscheinlichkeiten zu erklären.

Sugiyama *et al.* analysiert<sup>72</sup> im Jahre 2000 die Wirkungen von S1P auf die Herzphysiologie. Er beschreibt dabei eine Sinustachykardie, die die höhere Herzfrequenz und damit zum Großteil den besseren MAP erklärt. Diese Sinustachykardie scheint den Herzmuskel allerdings nicht zu ermüden, da die behandelten Mäuse ein vitaleres Verhalten zeigen. Sugiyama beschreibt aber auch, dass S1P eine minimale negativ inotrope Wirkung auf das Herz hat. Diese Wirkung war in unseren Versuchen weder bei septischen Mäusen noch bei gesunden Mäusen reproduzierbar, im Gegenteil schnitten sie in Inotropiewerten leicht besser ab, ohne dass die Werte signifikant höher waren. Dies liegt am ehesten daran, dass die Mäuse die Vorläufersubstanz SPH erhalten.

Die Erkenntnisse von Sugiyama *et al.* werden auch nicht im M-Mode bestätigt. Auch da werden Ejektionsfraktion und Fractional Shortening durch die Behandlung um 10,5 bzw. 5,5 Prozentpunkte von  $40,1 \pm 5,6$  auf  $50,7 \pm 0,26$  und von  $19,5 \pm 3,2$  auf  $25,0 \pm 0,13$  verbessert. (siehe Kapitel 3)

Das organphysiologische Korrelat, das die Kompensationsmechanismen der Mäuse erklärt, konnte sowohl qualitativ als auch quantitativ durch die Permeabilitätsanalyse an den Ohrgefäßen im Rahmen der 2-Photonen Mikroskopie und durch eine Immunhistologie der Gefäße des Herzens und des Muskels validiert werden.

In der 2-Photonen Mikroskopie nimmt die Fluoreszenz als Maß der Extravasation um das 36-fache zu, in der behandelten Gruppe um das 11-fache. Dieser spürbare Unterschied ist über die gesamte Versuchszeit festzustellen. Zu jedem Zeitpunkt ist die Kontrollkurve höher als die behandelte Gruppe. Die p-Werte in den jeweiligen T-Tests fangen bei 0,04 an und nehmen konsekutiv ab ( $4 \cdot 10^{-4}$  nach 4 Minuten). Somit ist die Permeabilität in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei behandelten Tieren. In der Tat verläuft die Kontrollkurve viel steiler nach Oben und flacht während der Beobachtungszeit nicht ab. Die Kurve, die behandelte Tiere darstellt, flacht sich zwischen 2,5 und 3 Minuten Beobachtungszeit ab. Der hierbei gemessene Faktor stagniert für die restliche Beobachtungszeit bei

Werten um 11 ( $10,8 \pm 2,6$  nach 2 Minuten 45 Sekunden und  $11,1 \pm 2,2$  nach 4 Minuten). Hier nimmt die extrazelluläre Permeabilität nicht wieder ab, sie steigt allerdings auch nicht mehr. Das könnte daran liegen, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der Extravasation des Farbstoffes und seiner Wiederaufnahme einstellt. Das mikrovaskuläre System zeigt hier also noch eine Restfunktion.

#### **4.2.1. Analyse der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Sepsis-3-Richtlinien.**

Laut Sepsis 3 wird der SOFA-Score für die Schwere der Sepsis herangezogen (siehe Kapitel 1.1.7.). Für einen Score laut diesen Richtlinien wäre ein arterielles Blutgas für den  $\text{PaO}_2$ , ein Blutbild mit Thrombozytenzahl Bilirubin, Kreatinin und eine Messung der Urinproduktion notwendig gewesen. Die Glasgow-Coma Scale wäre hier durch das Verhalten der Maus ersetzt worden und der Blutdruck wäre als MAP in den Score eingeflossen. Da in diesem Modell keine Vasopressoren verwendet wurden, hätte auch dieser Parameter verändert werden müssen. Der Aufnahme des Blutdruckes in den Score standen wir kritisch gegenüber, denn mit dem jetzigen TierSchG würden die Mäuse beendet werden, sobald der RR einmalig 40 mmHg wäre. Dennoch ist er ein sehr valides Kriterium für das Überleben.

#### **4.2.2. Diskussion und Entwicklung des Blutdrucks**

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein vor der Sepsis höherer Blutdruck die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöht. Um nun die Frage zu beantworten, wie sich ein niedriger Blutdruck während der Sepsis auswirkt und damit ein vollständiges Bild des Einflusses der Variable „Blutdruck“ auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zu bekommen, haben wir uns mit den Mäusen beschäftigt, bei denen der Blutdruck nicht messbar war (d.h.  $\text{RR} < 40 \text{ mmHg}$ ). Die Fragestellung ist dabei, ob ein nicht messbarer Blutdruck die Mortalität dieser Mäuse erhöht. Bei beiden Gruppen wurde daher zunächst als einziges Kriterium beobachtet welcher Anteil der Mäuse, der über den gesamten Versuchszeitraum mindestens einmal keinen messbaren Blutdruck hatte, an genau diesem Zeitpunkt gestorben ist oder beendet wurde (ohne zwischen behandelt und unbehandelten Mäusen ohne eine Zeitangabe zu unterscheiden).

Von den 50 Blutdruckmessungen innerhalb der ersten 36 Stunden des Sepsisversuch, konnte in 23 Fällen ein Blutdruck gemessen werden. Vier von diesen Mäusen mussten beendet werden. Dies entspricht 17,3%. In den restlichen 27 Messungen, in denen nicht messbare Blutdrücke festgestellt wurden, mussten 13 Mäuse beendet werden. Dies entspricht mit 48,1% fast dem Dreifachen. Der angewandte  $\chi^2$ -Test zeigte ein Signifikanzniveau von  $p = 0,022$ . Das bedeutet, dass die Sterbewahrscheinlichkeit der Mäuse signifikant erhöht ist, wenn die Bedingung „ $\text{MAP} < 40 \text{ mmHg}$ “ erfüllt ist.

Die Wahrscheinlichkeit einer septischen Maus zu versterben, wenn ein MAP von 40 mmHg oder weniger gemessen wurde, ist daher signifikant höher. Es spielt dabei keine Rolle ob die Maus dabei mit SPH behandelt worden ist oder nicht. Dies bestätigt die bereits bekannte Annahme, dass der Blutdruck signifikant mit dem Überleben korreliert. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt nach 24 Stun-

den. Es sterben 9 von 10, das heißt 90% der Mäuse, die keinen messbaren Blutdruck haben, im Vergleich zu 54,5% (6/11) der Mäuse mit messbarem Blutdruck. (Der p-Wert im  $\chi^2$ -Test entspricht 0,072)

Wenn man mit einem anderen  $\chi^2$ -Test SPH Mäuse und Kontrollmäuse über den ganzen Versuchszeitraum vergleicht, offenbart er (mit einem p-Wert von 0,79), dass SPH Mäuse mit einem nicht messbaren MAP keine besseren Überlebenschancen haben als die Kontrollmäuse mit derselben Hämodynamik. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit eines nicht messbaren Blutdruckes bei einer Messung in der SPH-Gruppe mit 37,5% (9/24) niedriger, als die, dass eine Kontrollmaus keinen messbaren MAP hat. Diese beziffert sich auf 73,1% (19/26). Das bedeutet, dass fast drei Viertel der Kontrollmäuse über die gesamte Versuchszeit sehr stark hypotone Werte aufweisen. Mit 60% haben über die Hälfte der SPH Mäuse während des Versuchs mindestens einmal keinen messbaren MAP, während 92% der Kontrollmäuse mindestens einmal keinen messbaren Blutdruck haben. Zwar haben auch teilweise Mäuse, die diesen Versuch überlebt haben, unter anderem einmal einen nicht messbaren Blutdruck aufgewiesen, der Stellenwert des Blutdruckes für das Überleben lässt sich allerdings nicht leugnen.

Der Vergleich der Kontrollen mit den SPH-Mäusen ohne messbaren Blutdruck ergab ohne Berücksichtigung des Zeitpunktes keinen signifikanten Unterschied. Deswegen wurden die Blutdrücke an verschiedenen Zeitpunkten visualisiert. Eine differenziertere Analyse durch einen  $\chi^2$ -Test, der die Mäuse ohne messbaren MAP, 12 Stunden nach Sepsisbeginn untersuchte, offenbart nach 12, 24 und 36 Stunden jeweils keinen signifikanten Unterschied ( $p_{12}=0,51$  und  $p_{24}=0,20$   $p_{36}=0,083$ ). Interessant bleibt aber der kontinuierlich sinkende p-Wert.

Wiederholt man diesen Test, indem man die Überlebensdaten von 24 und 36 Stunden kumuliert, findet man einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,033. Das bedeutet, dass die Mäuse, die früh einen starken und akuten Blutdruckabfall erfahren (innerhalb der ersten 12 Stunden) weniger von einer SPH- Therapie profitieren als jene bei denen er erst nach 24 oder 36 Stunden sinkt und der Effekt eher langfristig eine Rolle spielt.

Es konnte also gezeigt werden, dass SPH behandelte Mäuse vor allem langfristig von der Behandlung profitieren, dass ihr Schock später auftritt und öfter reversibel ist. Der Einfluss des Parameters „Blutdruck“ auf die Überlebenskurve wird im Folgenden erläutert.

Der MAP berechnet sich aus einem Drittel des systolischen und zwei Drittel des diastolischen Blutdruckes, weil dies in Ruhe der jeweiligen Fraktion der Herzaktionsphasen entspricht. Bei einer Tachykardie verkürzt sich die Diastole zugunsten der Systole. Dies ist bei den Ergebnissen nicht berücksichtigt worden.

Nach 12 Stunden ist der MAP der SPH behandelten Mäuse signifikant höher als der der Kontrollen. Dieser Unterschied ist nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Das liegt an mehreren Gründen. Zum einen misst das Gerät mittlere Drücke nur ab 40 mmHg und viele Mäuse befinden sich 24 Stunden nach Induktion unter diesem Messwert. Dennoch fließen sie als Mäuse mit einem MAP von 40 mmHg mit ein, was die Werte vor allem der Kontrollen nach oben korrigiert und den Mittelwert um 40 mmHg zentriert. Die Daten verlieren dadurch an Präzision. Das erklärt die hohe Standardabweichung von 33,06% in den Kontrollen. Des Weiteren fehlen zwei Mäuse in der Statistik der Kontrollmäuse, weil sie nach 12 Stunden gestorben sind, während in der S1P Gruppe noch alle Mäuse vertreten sind. Differentialdiagnostisch ist auch eine Toleranzbildung gegen das SPH oder eine toxische Wirkung durch Akkumulierung nicht auszuschließen. Beschrieben wurde dies in der Literatur bisher nicht.

Möglich wäre eine verstärkte Aktivierung des S1P<sub>3</sub>, bei erhöhten S1P Spiegeln durch Akkumulation mit leichter endothelialer Destabilisierung. Für diese These spricht, dass S1P nicht der einzige Reiz für die Aktivierung des S1P<sub>1</sub> ist, sondern auch sogenannter „shear laminar stress“ dazu führen kann<sup>95</sup>.

Dieser findet zu Beginn der Sepsis wahrscheinlich vermehrt statt und reduziert sich nach Abklingen des primären Reizes. Bei noch erhöhten S1P-Spiegeln könnte der S1P<sub>3</sub> vermehrt aktiviert werden und die Genesung hinauszögern.

Die Therapie der Mäuse unterscheidet sich in diesem Punkt von der intensivmedizinischen Therapie beim Menschen, da hier strikt nach Therapieschema und Gewicht der Maus eine Medikamentendosis gegeben wird, die beim Menschen längst an seinen Bedarf anpasst worden wäre. (z.B ggf. Steigerung einer etwaigen Katecholamin/Vasopressordosis). Zusätzlich besteht die humane Intensivmedizinische Betreuung aus mehr Geräten und Überwachung, die bei der Maus nicht durchgeführt wurden (arterielle Blutgasmessung, invasiv arterielle Drücke), weil man z.B. für den Goldstandard der invasiv arteriellen Messung postoperativ obligatorisch lethale Kathetermessungen benötigen würde und der Endpunkt nicht mehr anhand des Scores weiterverfolgt werden könnte. Das gewichtsadaptierte SPH-Spritzschema ist in diesem Kontext die beste Annäherung die möglich war.

Ebenfalls möglich ist ein Effekt ähnlich dem der „early goal directed therapy“. Die induzierte Sinustachykardie mit Steigerung des Blutdrucks und Gefäßwiderstandes zu Beginn der Sepsis und die Stabilisierung der Mikrozirkulation, (die sich unter anderem durch höhere Perizytenzahlen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h zum Ausdruck bringt) führen zu einem verspäteten Krankheitsbeginn und einem milderen Krankheitsverlauf. Vergleicht man innerhalb der PBS-Gruppe die MAP nach 12 und 24 Stunden, ist der MAP nach 24 Stunden signifikant höher, in der SPH-Gruppe ist dies nicht der Fall. Man kann also definitiv von einer Gefäßprophylaxe sprechen.

### 4.2.3. Die Remission

Bei den überlebenden Mäusen stellt sich die Frage wann die Remission beim LPS-induzierten Sepsismodell beginnt. Schaut man sich die analysierten Parameter einzeln an, dann verbessert sich bei den Überlebenden nach 12 bis 24 Stunden zunächst die vaskuläre Dysfunktion. Nach 24 bis 36 Stunden nehmen das Endothel und die Perizyten in Herz und Muskel wieder zu und die Mäuse zeigen ein gesunderes Verhalten und höhere Blutdruckwerte, bevor die Maus durch anabolen Stoffwechsel im weiteren Verlauf nach 36 bis 48 Stunden wieder Gewicht zunimmt.

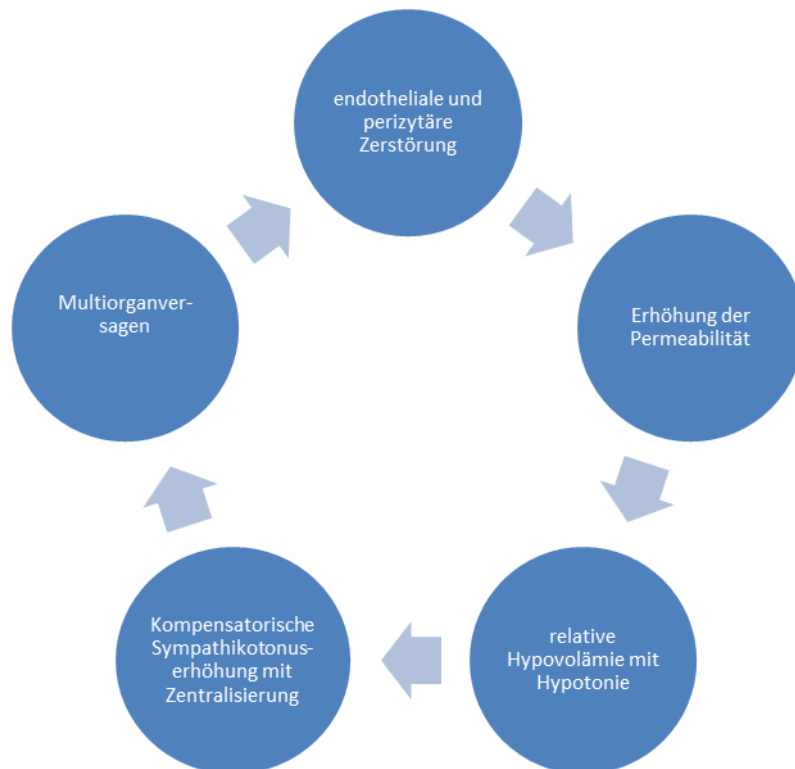


Abbildung 60: Die Angriffspunkte des SPH in der Sepsis sind die ersten drei Punkte des Teufelskreises

### 4.2.4. ELISA

Eventuelle Fehlerquellen bei dem ELISA sind unsauberes Arbeiten bei der Verdünnungsreihe der Kontrolle oder der Proben, oder eine zu lange Unterbrechung der Kühlkette. Zwar haben murines und menschliches IL-6 nur 41% Sequenzäquivalenz und die Spiegel sind bei den Mäusen sehr viel höher, aber dieser Test dient nur zum Nachweis der Sepsis. Die normale Halbwertszeit von wenigen Minuten kann sich in der Sepsis erhöhen, wenn vergleichsweise viel mehr Substrat als Enzym existiert oder wenn der lösliche IL-6 Rezeptor hohe Blutkonzentrationen aufweist.<sup>131</sup> Das erklärt die so hohen Werte auch nach 120 Stunden. Die in Kapitel 3 abgebildete Kurve zeigt grob den Verlauf der IL-6 Spiegel. Die große Streuung zwischen den Werten erklärt sich durch die interindividuell unterschiedliche Reaktion auf Inflammation.

Je länger man nach Induktion der Sepsis wartet, desto schwerer wird der Nachweis. Vor allem bei überlebenden Mäusen muss gezeigt werden, dass sie tatsächlich eine Sepsis hatten. Allerdings ist ein Überlebensunterschied schwer nachzuweisen, wenn der Versuch nicht lange genug läuft. Daher wurde als Kompromiss der Versuch nach 120 Stunden beendet. In den ersten 72 Stunden verschwinden in der Regel alle Schäden der LPS-Sepsis und die restlichen Stunden dienen zur Beobachtung der Erholung.

#### 4.2.5. Zwei Photonen Mikroskopie

Die in der Zwei Photonen Mikroskopie gemessene Filtration ist ein Maß für die Permeabilität im Gefäß. Die Filtration ist aber auch vom Blutdruck abhängig. Da im Kapitel 3 gezeigt wurde, dass der MAP behandelter Mäuse signifikant höher ist, bedeutet das, dass die Lumineszenzkurve die beide Gruppen vergleicht, den positiven Effekt des SPH unterschätzt. Dennoch ist die SPH-Gruppe signifikant besser.

#### 4.2.6. MACS und FDG-Aktivität

Bei den Leukozyten handelt es sich um eine gemischte Population, von denen ein Teil immunmodulierend wirkt. Der Erklärungsansatz der MACS-Ergebnisse ist folgender: Die Gabe von LPS stimuliert die unkontrollierte Aktivierung von Monozyten, die ungezielt zu einer überschießenden Inflamationsreaktion mit konsekutiver Permeabilitätssteigerung führt. Vom immunologischen Standpunkt scheint SPH in den Pilotexperimenten die LPS induzierte Monozytenaktivität herunterzuregulieren. Dies korreliert mit der Literatur, die eine Senkung des sogenannten „oxidativen Burst“ in Monozytenkulturen durch Zugabe von SPH beschreibt.<sup>149</sup>

Die Leukozyten, die durch differenzierte und spezifischere Funktionsmechanismen unter anderem modulatorisch auf eine Entzündung Einfluss nehmen könnten, werden durch LPS in ihrer Funktion supprimiert. Obwohl auch SPH diese Aktivität halbiert, ist nicht klar ob diese Halbierung nicht zugunsten des antiinflammatorischen Effektes ausfällt. In diesem Sinne wären hier noch Versuche mit noch spezielleren Leukozytenuntergruppen notwendig gewesen. SPH wirkt allerdings chemotaktisch und zieht Lymphozyten an, was eine anti-inflammatorische Wirkung sehr wahrscheinlich macht. Am ehesten führt die Kombination von SPH und LPS zu einer (durch Interleukine reversiblen) Erhöhung der Leukozytenaktivität, am ehesten weil LPS zu einer erhöhten S1P-Produktion führt. Dies bleibt aber nur eine Hypothese.

Die Toxizität des LPS würde sich durch die Begünstigung einer unkontrollierten unspezifischen monozytären Inflammation und die Unterbindung einer kontrollierten lymphozytären Reaktion des Körpers erklären. Diese immunologischen Angriffspunkte erhoffen wir uns vom SPH. Da nur die Aktivität der Immunzellen gemessen werden konnte, dabei aber nicht zwischen inhibitorische oder pro-inflammatorische Wirkung differenziert werden kann, bleibt es schwer diese Pilotexperimente zu deuten. Um die Rolle des SPH und S1P in der Immunabwehr bei der Sepsis zu klären, sind daher noch weitere Versuche notwendig.



## 4.3. Ansätze für zukünftige Forschung

In diesen Versuchen wurden verschiedene Angriffspunkte des S1P aufgezeigt. Die Migration von Zellen, die Antiapoptose, die Regulation der Gefäßbarriere, die Beeinflussung des Gefäßtonus und die Erhöhung der Herzfrequenz beeinflussen den Krankheitsverlauf positiv. Um diese Effekte einzeln genauer beschreiben zu können, werden weitere Versuche notwendig sein. Eine Zellkultur mit einem „Tube formation assay“ mit Endothelzellen, Perizyten, LPS und S1P, eine Messung der cDNA anti-apoptotischer Gene, eine S1P-Gabe an isolierten Gefäßen oder an isolierten Herzen wären weitere Versuche, die den Stellenwert der einzelnen Komponenten näher erklären könnten. Die Permeabilität könnte gezielt anhand von Tsad-Mäusen analysiert werden. Tsad-Mäuse haben eine Mutation in der VEGF-Signaltransduktionskaskade. Diese verhindert die physiologisch durch VEGF induzierte Permeabilitätserhöhung<sup>83</sup>. Der dabei in der Embryogenese überlebensnotwendige Schenkel der Gefäßneubildung ist nicht beeinträchtigt. Dadurch sind die Mäuse phenotypisch gesund. Sie eignen sich daher sehr gut zur Analyse der Rolle der VEGF-induzierten Permeabilität in der Sepsis. Außerdem ermöglichen diese Mäuse die Wirkung einer Prophylaxe zu erforschen. Sowohl SPH als auch das Tsad-Konstrukt sind Stoffwechselwege, die vor der LPS-Injektion bereits aktiviert sind. Diese Experimente könnten helfen die umstrittene „early goal directed therapy“ zu validieren, oder sie zumindest teilweise zu widerlegen.

Auch eine niedrigere LPS Dosis, das heißt eine mildere Sepsis wäre ein denkbare Experiment, um mehr überlebende Kontrolltiere untersuchen zu können. Auch das Gegenteil, wie eine stärkere Sepsis in einem CLP-Modell wäre denkbar.

Ebenfalls möglich wäre die Differentialanalyse der Wirkungen der verschiedenen S1P-Rezeptoren durch die S1P- Analoga FTY720-P, SEW 2871, KPR 201 VPC24191 und VPC23019, die sich in ihrer Affinität für verschiedenen Rezeptoren unterscheiden und damit die Rezeptoren identifizieren können, die für den Überlebensvorteil in diesem Modell verantwortlich sind.

### 4.3.1. Histologie

Eine Anfertigung mikroskopischer Leber und Nierenpräparate wären auch sehr aufschlussreich gewesen. Im Rahmen eines MODS spielt die Dysfunktion multipler Organe eine große Rolle. Um diese quantifizieren zu können, wären histologische Schnittbilder von Niere und Leber mit einer Regelfärbung (Zum Beispiel Hämatoxylin/Eosin) möglich gewesen. Alternativ hätte eine Schadensquantifizierung durch Messung der Myeloperoxidase (MPO) (in Neutrophilen) und der Malondialdehydeaktivität (Marker für oxidativen Stress) in diesen Zellen stattfinden können.<sup>74</sup> In der Regulation des Blutdrucks spielen neben der Perizyten und Endothelzellen wahrscheinlich auch die glatten Muskelzellen eine Rolle. In diesem Sinne wurde anhand des Färbeprotokolls für Perizyten und Endothelzellen ein modifiziertes Protokoll für glatte Muskelzellen erstellt und in der Leber, dem Herz dem Skelettmuskel und der Aorta getestet. Aufgrund der kleinen Fallzahl und des Stadiums dieses Experiments konnte noch keine klare Aussage über den Verlust beziehungsweise die Beeinflussung eines möglichen Muskelzellverlustes und seine potentiellen Auswirkungen in der Sepsis gemacht werden.

### 4.3.2. Echokardiographie als Früherkennung

In unseren Versuchen wurde die Echokardiographie als Methode verwendet, die diverse Parameter der Herzleistung beschreibt. Denkbar wäre auch ein engmaschiges Monitoring der Mäuse, bei denen man eine Sepsis erwartet. Diese Fragestellung wäre von einem epidemiologischen Standpunkt in Hinsicht auf Früherkennungsmaßnahmen und diagnostische Tests möglicherweise zielführend. Ziel könnte die Quantifizierung einer potentiellen septischen Hyperzirkulation und eine Früherkennungsklassifikation sein. Ein solcher Parameter könnte für den SOFA-Score große Bedeutung haben. Er berücksichtigt als kardiovaskulären Parameter nur den erniedrigten MAP, der ein Spätsymptom der Sepsis darstellt.

### 4.3.3. qPCR

Zusätzlich zum ELISA, wurden per qPCR die cDNA mehrerer in der Inflammation oder Permeabilitäts-erhöhung wichtiger Proteine gemessen. Unter anderem wurde mit Herzgewebe die cDNA von IL-6 gemessen. Außerdem wurden die cDNA-Spiegel von CCL2 als Entzündungsmarker, VE-Cadherin, N-Cadherin, SPH-Kinase und S1P-Lyase gemessen. CCL2 und IL-6 sollten als Entzündungsmarker die erfolgte Sepsis validieren. Der gemessene Unterschied war aufgrund der zu kleinen Stichproben nicht signifikant. Dennoch waren die p-Werte bei dieser Stichprobengröße mit 0,09 und 0,08 sehr niedrig. Es wären hier größere Stichproben wünschenswert gewesen.

Aus der qPCR für Cadherin-DNA lässt sich zuerst entnehmen, dass eine Stimulation mit LPS egal in welcher Gruppe zu einer erhöhten Expression von Cadherinen führt. Die cDNA von sowohl N- als auch VE-Cadherine verdoppeln sich bei LPS-behandelten Kontrollen. Bei S1P behandelten Tieren findet auch eine Erhöhung statt, diese ist aber nicht so ausgeprägt. Denkbar wäre, dass der bessere Gefäßstatus die Expression weniger Cadherine erfordert, da dort noch mehr adhärente Verbindungen zwischen den Zellen existieren. Die prophylaktische SPH-Gabe steigert die vaskuläre Integrität.

### 4.3.4. Restitutio oder Reparatio

Eine für die Klinik und den durch die Sepsis hervorgerufenen finanziellen Schaden wichtige Unterscheidung ist die zwischen Restitutio (ad integrum) und Reparatio, das heißt, ob die überlebenden Mäuse nach ihrer Erholung genauso leistungsfähig sind wie vor der Sepsis. Das ist beim Menschen hinsichtlich sozialer und beruflicher Wiedereingliederung von enormer Bedeutung. Es wäre daher interessant gewesen nach mehr als 120 Stunden weiterhin Blutdruckmessungen, Echokardiographien und gegebenenfalls die Reaktion auf einen erneuten LPS-Reiz zu untersuchen.

## 4.4 Abschließende Wertung

### 4.4.1. Bedeutung außerhalb der Spezies Maus

Nicht nur beim Menschen oder bei der Maus spielt das Thema Sepsis eine wichtige Rolle, vor allem die zuletzt stark diskutierte Kontroverse über den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika in der Fleisch- und Mastindustrie vergegenwärtigen, dass bakterielle Infekte einen großen (finanziellen) Schaden für Mensch und Tier hervorrufen. Insbesondere beim Schwein, bei dem zum Beispiel Streptokokkeninfektionen wie *Streptococcus suis* zu schweren Infektionen führen können, die zum Teil auch humanpathogen sind, wäre ein Sepsismodell, das die Grundzüge der Erkrankung beschreibt eine sehr aussichtsreiche Alternative zur Maus, da Schweine dem Menschen physiologisch und anatomisch ähnlicher sind. Die dafür notwendigen LPS-Dosen von mindestens 2 g LPS (bei z.B. 20 mg/kgKG und 100 kg Schweinegewicht) wären aber pro Schwein sehr teuer (im fünfstelligen Bereich) und ihre Verabreichung wäre problematischer zu handhaben. Damit wären hohe Fallzahlen ziemlich aufwendig. Daher wäre für ein Sepsismodell am Schwein eine CLP oder eine FI in ihrer Durchführung eleganter als das LPS Modell. Es finden auch Pilotexperimente mit kleinen untoxischen Dosen LPS am Menschen statt, diese sind aber nicht für die Sepsisforschung geeignet.

### 4.4.2. Die Genetik als Wegweiser für eine individualisierte Therapie der Sepsis

Die Inflamationsreaktion des Körpers ist eine gleichbleibende Reaktion, die von unterschiedlichen Zelltypen und Mediatoren Gebrauch macht. Dennoch ist unser Immunsystem interindividuell sehr unterschiedlich und in der Lage zu lernen oder sich anzupassen. Impfungen führen zum Beispiel zu einer schnelleren und stärkeren Antwort auf einen sich wiederholenden Immunreiz. Bakterielle bzw. virale Infekte führen zur Selektion verschiedener Zellklone. Bestimmte Keime, die bei einigen Patienten Infektionen auslösen, sind für andere genauso immunkompetente Menschen ungefährlich/apathogen.

Selbst innerhalb derselben Bakteriengruppe können Infektionen völlig unterschiedliche Manifestationen haben. Das Bakterium *Salmonella enterica* kann je nach Serovar „typhi“ oder paratyphi zwei völlig unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen. Der Serovar paratyphi ist ein klassischer Durchfallserreger. Er führt zu einer Durchfallserkrankung mit SIRS-Kriterien wie Fieber und Tachykardie. *S. typhi* hingegen zeigt ein für einen Infektionserreger unübliches, nahezu paradoxes Krankheitsbild mit Obstipation und der sogenannten „relativen Bradykardie“, das heißt eine Deckelung der Herzfrequenz bei 60 Schläge/min. Es wäre zu erwarten, dass aufgrund der erhöhten Stoffwechselaktivität die Herzfrequenz um 8 Schläge/min/°C Körperkerntemperatur steigt. Dennoch ist die Deckelung der Herzfrequenz bei der relativen Bradykardie ein bisher ungeklärtes Phänomen.

Ebenfalls ungeklärt ist, wieso einige Patienten, die sich infiziert haben und die Keime in sich tragen bei voller Immunkompetenz keinerlei Krankheitszeichen zeigen aber dennoch andere Personen infizieren können. Bei der Obduktion von Mary Mallon, eine aus Irland in die USA eingewanderte Köchin zeigte sich eine Kolonisation von Salmonellen in ihrer Gallenblase. Sie hatte zu Lebzeiten um das 20.

Jahrhunderts nachweislich mehrere Menschen (darunter drei mit Todesfolge) durch ihre berufliche Tätigkeit angesteckt.<sup>132</sup>

Das Verständnis des Immunsystems dieser Patienten und des Einflusses verschiedener Genvarianten, könnte das Krankheitsverständnis der überschießenden Immunreaktion, und der Hyperzirkulation in der Sepsis verbessern und helfen Hochrisikopatienten im Sinne einer individualisierte Therapie zu betreuen. Sie könnten in näherer Zukunft dazu beitragen, die Dogmen (z.B. Kontamination→Infektion→Sepsis) der Infektionslehre aufzubrechen.

Das Beispiel der sogenannten „Typhoid Mary“ ist auch ein gutes Beispiel für die Uneinsichtigkeit der Patienten. Sie weigerte sich zu Lebzeiten Blut oder Stuhluntersuchungen durchzuführen, weil sie nach eigener Aussage nie an dieser Krankheit gelitten habe. So sehr solche Einzelfälle für die Medizin lehrreich sein können, sollte der Prävention solcher Ereignisse den größeren Stellenwert eingeräumt werden. Sie wird in näherer Zukunft das beste Mittel sein, die steigende Inzidenz und Mortalität der Blutvergiftung einzudämmen. In Hinsicht auf die noch immer sehr hohe Letalität wird die weitere Erforschung der Pathophysiologie der vaskulären Dysfunktion notwendig sein.

#### 4.4.3. Übertragung auf den Menschen

Die Therapie der Sepsis beim Menschen besteht aus einer Fokussanierung mit Débridement und Spülung einer antibiotischen, antimykotischen, oder virustatischen Therapie und kreislaufunterstützenden Maßnahmen. Weitere Maßnahmen, die etwa Einfluss auf das Immunsystem nehmen oder direkt die vaskuläre oder endotheliale Dysfunktion beeinflussen, finden nur in vereinzelten Fällen statt.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Schwere der Sepsis durch die Beeinflussung des Gefäßstatus verringert werden kann. Es müssen jetzt neben dem SPH weitere Substanzen identifiziert werden, die in der Lage sind gefäßprotektiv zu wirken.

Dennoch lassen sich unsere Anstrengungen nicht eins zu eins in die Humanmedizin übertragen. Das LPS- Modell bleibt ein Maussepsismodell. Es muss durch weitere Versuche an Schweinen, Primaten und durch eine Verlängerung der Überlebensdauer in der intensiveren CLP validiert werden. In diesen Modellen wäre auch mit mehr Residualschaden zu rechnen, der aufgrund der abakteriellen Entzündungsreaktion hier weitesgehend ausbleibt.

Viele im Tierversuch erfolgreiche Substanzen haben die Translation in die Humanmedizin nicht gemeistert. Das liegt zum einen an den Unterschieden zwischen den verschiedenen Modellen der Sepsis im Tierversuch und dem klinischen Krankheitsbild und wahrscheinlich auch an anatomischen und physiologischen Unterschieden, die uns von anderen Spezies unterscheiden. Komorbiditäten wie die Immunsuppression, vergangene Operationen, Mangelernährung oder fortgeschrittenes Alter werden nicht in solchen Modellen berücksichtigt.<sup>135</sup> Eine Translation dieses Mausmodells in die Humanmedizin würde z.B. ohne Anpassung an die Adipositas einziger Patienten aufgrund des Scores scheitern. Letztendlich sind die Hürden, die eine Substanz zu meistern hat, bevor sie am Menschen zugelassen wird aus Sicherheitsgründen sehr hoch, was sehr viele Wirkstoffe disqualifiziert.

#### 4.4.4 S1P und die Therapie des Menschen

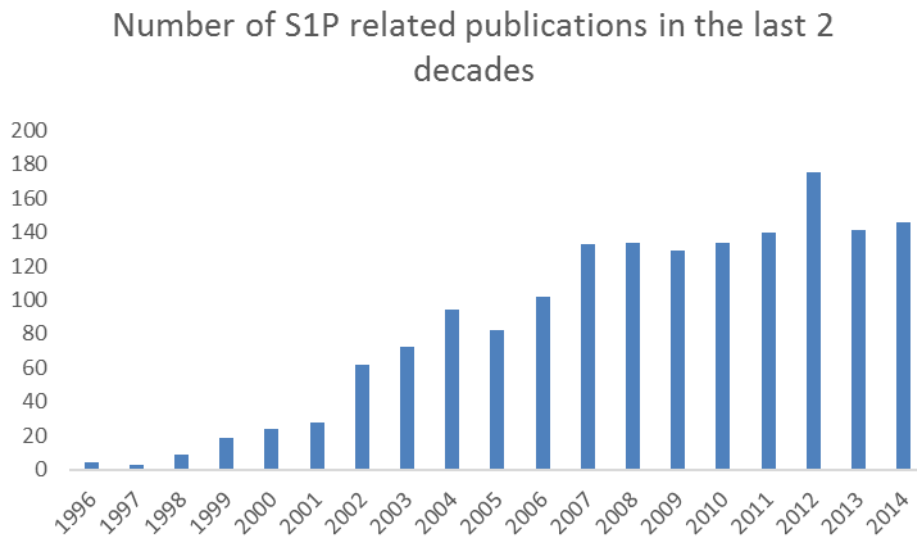
Im Vorfeld dieser Arbeit gab es viele Hinweise darauf, dass während der Sepsis unter anderem eine Störung des SPH/S1P-System stattfindet, welches sehr eng reguliert ist. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden, dass das eine Behebung dieser Stoffwechselstörung durch SPH Gabe in der Lage ist, die durch die Sepsis hervorgerufene panvaskuläre Dysfunktion durch endotheliale Stabilisierung, perizytäre Rekrutierung, Optimierung des PC/EC Quotienten und Miteinbeziehung der glatten Muskulatur abzuschwächen.

In Hinsicht auf eine Therapie der Sepsis ist eine Restitutio ad integrum durch alleinige SPH- Gabe nicht vorstellbar. Allerdings kann die Gabe der Substanz im Rahmen eines multimodalen Konzeptes an mehreren Wirkorten unterstützend wirken. Zunächst einmal könnte der an der „early goal directed Therapy“ von Rivers et al.<sup>26</sup> kritisierte niedrige Volumeneffekt von kristalloiden Lösungen gesteigert werden. Dadurch wäre eine Blutdruckerhöhung (mit Einsparung von Vasopressoren) ohne weitere kardiale Einschränkung und damit eine Abschwächung oder Verzögerung der septischen Hyperzirkulation möglich. Ferner könnte SPH die erste Substanz einer Gruppe von Mediatoren sein, die den Gefäßschaden reduzieren und eine Therapiesäule in der Sepsis darstellen.

Es muss an dieser Stelle dennoch darauf hingewiesen werden, dass eine in der Maus beobachtete Veränderung im Menschen nicht unbedingt denselben Effekt hervorruft. Vor einer möglichen klinischen Anwendung sind daher noch weitreichende Studien zur Wirksamkeit in der bakteriellen Sepsis, z.B. im Rahmen einer CLP und zu systemischen (Langzeit-)Nebenwirkungen notwendig. Gerade aufgrund der vielen Haupt- und Nebenwirkungen wären klinische Vorarbeiten mit den synthetischen und z.T. partiellen Analoga (AUY945, SEW 2871, KPR 201, VPC24191 und VPC23019 siehe Kapitel 1) sinnvoll. In Zukunft könnte eine dieser Substanzen eine Rolle in der Therapie der Sepsis spielen.

#### 4.4.5. Ausblick: Die Sepsis und S1P

Die Erstellung neuer diagnostischer Leitlinien wie der SOFA-Score und der Zusammenschluss diverser hauptsächlich anästhesiologischer Kliniken und Forschungsinstitute in der sogenannten „Surviving Sepsis Campaign“ zeigt die Bereitschaft sich der bisher unzureichend verstandenen Pathophysiologie dieser Erkrankung zu stellen und Meilensteine klinischer und experimenteller Forschung zu teilen. Diskutiert werden dort sowohl Therapieleitlinien selbst als auch das Patientenmanagement. Dieses muss individuell an die Schwere der Erkrankung, den Vorerkrankungen und bald eventuell an den Genotyp des Patienten angepasst werden. Dabei könnten SPH, S1P oder eines seiner Analoga eine erfolgsversprechende Prophylaxe darstellen. Die genaue Messung der S1P-Spiegel, das Verständnis des komplexen C1P-SPH-S1P-Rheostat, und seine Funktionen bei diversen intrazellulären Signalkaskaden, wie die Zellproliferation, die Zellmigration, die Angiogenese und die Autophagie<sup>133</sup> könnten S1P und seine Analoga in verschiedenen Krankheitsbildern als therapeutische Option aufzeigen.<sup>134</sup> Im vereinfachten Sepsismausmodell der LPS-induzierten Sepsis konnte dies erfolgreich gezeigt werden.



**Abbildung 61: Das steigende wissenschaftliche Interesse an S1P nach Pubmed**

# Abkürzungsverzeichnis

AKI	acute kidney injury
ANF	Narkoseantagonisierung mit Atipamezol, Naloxon und Flumazenil
ANG ½	Angiopoetin ½
ANP	Atriales natiuretisches Peptid
ANZICS	Australian and New Zealand Intensive Care Studies
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ARISE	Australian Resuscitation of Sepsis Evaluation trial
B-Mode	Bild Mode der Sonographie
BQ	Becquerel ( $s^{-1}$ )
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CCL2	chemokine ligand 2 auch MCP1
CLP	Caecal ligation (and) puncture
CPR	C-reaktives Protein
DAMP	Damage associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
e	Euler'sche Zahl
EC	Endothelzellen
ECLW	Extrakorporales Lungenwasser (Extracorporal lung water)
EDD	Enddiastolischer Ventrikeldurchmesser
EDV	Enddiastolisches Volumen
EGDT	Early goal directed therapy
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESD	Endsystolischer Ventrikeldurchmesser
ESV	Endsystolisches Volumen
FDG	Fluorodesoxyglucose
FS	Fractional Shortening
g	Gravitationskonstante, auf Meereshöhe $9,81m s^{-2}$
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GE	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-messenger-Ribonukleinsäuren normierte Einheiten
GILZ	Glucocorticoid induced leucine zipper
h	Stunden
HDL	High density lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HPF	High Power Field
HZV	Herzzeitvolumen
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukine (z.B Interleukin 6)
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
LBP	Liposaccharid bindenden Protein
LDL	Low density Lipoproteins
LPS	Lipopolysaccharide
M-Mode	Motion Mode
MAP	Mittlerer arterieller Druck

MCFP/MSFP	Mean circulatory filling pressure/ Mean systemic filling pressure
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1
MMF	Narkosemischung aus Midazolam, Medetomidin, Fentanyl
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiorganversagen (engl. Multi- organ dysfunction syndrome)
mRNA	messenger Ribonukleinsäuren
MSE	Mittlere quadratische Abweichung
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
NO	(Nitric oxide) Stickstoffmonoxid
NRZ	Nationales Institut für die Surveillance von nosokomialen Erkrankungen
OPSI	Postsplenektomieinfektionssyndrom (Overwhelming Post Splenectomy Infection syndrome)
p-Wert	Signifikanzniveau eines t-Testes
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PC	Perizyten
PCR	Polymerasen Ketten Reaktion
PCT	Procalcitonin
PDGF-β	Platelet derived growth factor
PIGF	Placental growth factor
RPM	Rotationen pro Minute
RR	Blutdruck nach Riva Rocci in mmHg
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAFE-Studie	Saline versus Albumin Fluid Evaluation
SHG	Second Harmonic Generation Microscopy
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom (Systemic inflammatory response syndrome)
SMA	Smooth Muscle Antigen
(q)SOFA	(quick)Sequential organ failure assessment (score)
SPH	D-Sphingosin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tβ4	Thymosin Beta 4
TierSchG	Tierschutzgesetz
TLR4	Toll-Like-Rezeptor 4
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRITC- Dextrane	Tetramethylrhodamine isothiocyanate Dextrane (molare masse 4400g/mol)
Tsad	T-cell specific adaptor
vCAM (CD 106)	Vascular cell adhesion molecule/protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
vSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells)
ZVD/CVP	Zentraler Venendruck/Central venous pressure



# Literaturverzeichnis

1. Rieth M.; Pharmazeutische Mikrobiologie: Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene (2012)
2. Levy MM., Fink MP., Marshall JC., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal SM., Vincent JL., Ramsay G.; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference *Intensive Care Med.* 2003 ;29: 530-8.
3. Levy MM., Fink MP., Marshall JC., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal SM., Vincent JL., Ramsay G.; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference *Crit Care Med.* 2003; 4:1250-6.
4. Aird W.; The Hematologic System as a Marker of Organ Dysfunction in Sepsis. *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78-7: 869-881
5. Lee A., Mirrett S., Reller LB., and Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:3546-3548
6. Gastmeier P., Geffers C.; Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006. In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* Bd. 133, Nr. 21, 2008, ISSN 0012-0472, doi:10.1055/s-2008-1077224, S. 1111–1115 (Digitalisat).
7. Werdan K., Müller-Werdan U., Schuster HP., Brunkhorst FM.; (2005) Sepsis und MODS Springer Verlag ISBN 978-3-662-45148-9
8. <http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/PPS-Abschlussbericht-Stand05-08-2013final.pdf>
9. Reinhart K.; New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct; 25(4): 609–634. doi: 10.1128/CMR.00016-12 PMID: PMC3485751
10. Su D., Roth RI., and Levin J.; Hemoglobin infusion augments the tumor necrosis factor response to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in mice. *Crit Care Med.* 1999; 27: 771–778
11. Singer M., Deutschman CS., Seymour CW., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard GR., Chiche JD., Coopersmith CM., Hotchkiss RS.<sup>1</sup>, Levy MM., Marshall JC., Martin GS., Opal SM., Rubenfeld GD., van der Poll T., Vincent JL., Angus DC.; The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).
12. Lentner JJ., Gruithuisen VPF.; *Hippocrates des Zweyten ächte medizinische Schriften*, ins Deutsche übersetzt. 1814, Munich, Germany
13. Machiavelli N.; The Prince, translated by WK Marriott2002. *eBooks@Adelaide*, The University of Adelaide Library, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia
14. Spink WW. 1978. Infectious diseases. Prevention and treatment in the nineteenth and twentieth centuries. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN
15. Spirer HF., Spirer L.; Semmelweis the statistician *Epidemiol Prev.* 1992 Mar;14(50):11-9. University of Connecticut, Stanford.PMID:1297590
16. Jockovich M.; Long-term complications of laparotomy in Hodgkin's disease *Ann Surg.* 1994 Jun; 219(6): 615–624. PMID: PMC1243206
17. Okabayashi T., Hanazaki K.; Overwhelming postsplenectomy infection syndrome in adults - a clinically preventable disease. *World J Gastroenterol.* 2008 Jan 14;14(2):176-9.
18. Kazumasa E.; A Case of Waterhouse-Friderichsen Syndrome Resulting from an Invasive Pneumococcal Infection in a Patient with a Hypoplastic Spleen *Case Rep Crit Care.* 2016; 2016: 4708086. Published online 2016 Jan 28. doi: 10.1155/2016/4708086 PMID: PMC4749788

19. Engel C.; Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study *Intensive Care Med* (2007) 33:606–618 DOI 10.1007/s00134-006-0517-7
20. <http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/774.php>
21. Angus DC.; Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10
22. Martin GS., Mannino DM., Eaton S., and Moss M.; The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000 *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546-54.
23. <http://www.welt.de/gesundheit/article109186499/Blutvergiftung-kann-lebenslange-Folgen-haben.html>.
24. Wei WJ.; New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern, *Chin Med J (Engl)*. 2015 Jul 20; 128(14): 1969–1976. doi: 10.4103/0366-6999.160566
25. Hauser AR.; Beyond Antibiotics: New Therapeutic Approaches for Bacterial Infections; *Clin Infect Dis*. 2016 Jul 1;63(1):89-95. doi: 10.1093/cid/ciw200. Epub 2016 Mar 29.
26. Rivers E., Nguyen B., Havstad S., Ressler J., Muzzin A., Knoblich B., Peterson E., Tomlanovich M.; Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock *N Engl J Med* 2001; 345:1368-1377 November 8, 2001 DOI: 10.1056/NEJMoa010307
27. The ARISE Investigators and the ANZICS Clinical Trials Group: Peake SL., Delaney A., Bailey M., Bellomo R., Cameron PA., Cooper DJ., Higgins AM., Holdgate A., Howe BD., Webb SA., Williams P.; Goal-Directed Resuscitation for Patients with Early Septic Shock. *N Engl J Med* 2014; 371:1496-1506 October 16, 2014 DOI: 10.1056/NEJMoa1404380
28. The ProMISe Trial Investigators Mouncey PR., Osborn TM., Power GS., Harrison DA., Sadique MZ., Grieve RD., Jahan R., Harvey SE., Bell D., Bion JF., Coats TJ., Singer M., Young JD., and Rowan KM., Trial of Early, Goal-Directed Resuscitation for Septic Shock *N Engl J Med* 2015; 372:1301-1311 April 2, 2015 DOI: 10.1056/NEJMoa1500896
29. Brandt S., Regueira T., Bracht H., Porta F., Djafarzadeh S., Takala J., Gorrasi J., Borotto E., Krejci V., Hildebrand LB., Bruegger LE., Beldi G., Wilkens L., Lepper PM., Kessler U., Jakob SM.; Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models. *Crit Care*. 2009;4:R186.
30. Marik PE.; Iatrogenic salt water drowning and the hazards of a high central venous pressure *Ann Intensive Care*. 2014; 4: 21. Published online 2014 Jun 21. doi: 10.1186/s13613-014-0021-0 PMID: PMC4122823
31. Legrand M., Dupuis C., Simon C., Gayat E., Mareo J., Lukaszewicz AC., Payen D. Association between systemic hemodynamics and septic kidney injury in critically ill patients: a retrospective observational study. *Crit Care*. 2013;4:R278
32. Tabrizchi R., Pang CC.; Effects of drugs on body venous tone, as reflected by mean circulatory filling pressure. *Cardiovasc Res*. 1992 May;26(5):443-8.
33. Rothe CF.; Mean circulatory filling pressure: its meaning and measurement. *J Appl Physiol* (1985). 1993 Feb;74(2):499-509. <sup>1</sup>.
34. Marik PE., Baram M., Vahid B.; Does central venous pressure predict fluid responsiveness? A systematic review of the literature and the tale of seven mares. *Chest*. 2008 Jul;134(1):172-8. doi: 10.1378/chest.07-2331.
35. Perner A., Haase N., Guttormsen AB., et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med* 2012; 367:124).
36. Finfer S., Bellomo R., Boyce N., et al. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med* 2004; 350:2247.

37. Landry DW., and Oliver JA.; The Pathogenesis of Vasodilatory Shock, *N Engl J Med* 2001; 345:588-595 August 23, 2001 DOI: 10.1056/NEJMra002709
38. Goldenberg NM., Steinberg BE., Slutsky AS., Lee WL.; Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis *Sci Transl Med.* 2011 Jun 22;3(88):88ps25. doi: 10.1126/scitranslmed.3002011.
39. Boomer JS., To K., Chang KC., Takasu O., Osborne DF., Walton AH., Bricker TL., Jarman SD. 2nd, Kreisel D., Krupnick AS., Srivastava A., Swanson PE., Green JM., Hotchkiss RS.; Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure *JAMA.* 2011 Dec 21; 306(23): 2594–2605. doi: 10.1001/jama.2011.1829 PMID: PMC3361243 NIHMSID: NIHMS378461
40. Boomer JS., Green JM., and Hotchkiss RS.; The changing immune system in sepsis: individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence.* 2014 Jan 1; 5(1): 45–56. Published online 2013 Sep 25. doi: 10.4161/viru.26516 PMID: PMC3916383
41. Walton AH., Muenzer JT., Rasche D., Boomer JS., Sato B., Brownstein BH., Pachot A., Brooks TL., Deych E., Shannon WD., Green JM., Storch GA., Hotchkiss RS.; Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis *PLoS One.* 2014; 9(6): e98819. Published online 2014 Jun 11. doi: 10.1371/journal.pone.0098819 PMID: PMC4053360
42. Hoppstädter J., Kessler SM., Bruscoli S., Huwer H., Riccardi C., Kiemer AK.; Glucocorticoid-induced leucine zipper: a critical factor in macrophage endotoxin tolerance *J Immunol.* 2015 Jun 15;194(12):6057-67. doi: 10.4049/jimmunol.1403207. Epub 2015 May 11...
43. Annane D., Sébille V., Charpentier C., Bollaert PE., François B., Korach JM., Capellier G., Cohen Y., Azoulay E., Troché G., Chaumet-Riffaud P., Bellissant E.; Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock, *JAMA* 2002 Aug 21; 288(7):862-71 *N Engl J Med.* 2008 Jan 10;358(2):111-24. doi: 10.1056/NEJMoa071366.
44. Sprung CL., Annane D., Keh D., Moreno R., Singer M., Freivogel K., Weiss YG., Benbenishty J., Kalenka A., Forst H., Laterre PF., Reinhart K., Cuthbertson BH., Payen D., Briegel J.; Hydrocortisone therapy for patients with septic shock.; CORTICUS Study Group *N Engl J Med.* 2008 Jan 10;358(2):111-24. doi: 10.1056/NEJMoa071366.
45. Cadirci E., Halici Z., Bayir Y., Albayrak A., Karakus E., Polat B., Unal D., Atamanalp SS., Aksak S., Gundogdu C.; Peripheral 5-HT7 receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats *Immunobiology.* 2013 Oct;218(10):1271-83. doi: 10.1016/j.imbio.2013.04.012. Epub 2013 Apr 27..
46. Chappell D., Jacob M., Becker BF., Hofmann-Kiefer K., Conzen P., Rehm M.; Expedition glyco-calyx. A newly discovered Great Barrier Reef *Anaesthesist.* 2008 Oct;57(10):959-69. doi: 10.1007/s00101-008-1445-4.
47. Pfeiffer S., Leopold E., Schmidt K., Brunner F., and Mayer B.; Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol.* 1996 Jul; 118(6): 1433–1440. PMID: PMC1909689
48. Avontuur JA., Stam TC., Jongen-Lavrencic M., van Amsterdam JG., Eggermont AM., Bruining HA.; Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med.* 1998 Jul;24(7):673-9.
49. Jacquet-Lagrèze M., Allaouchiche B., Restagno D., Paquet C., Ayoub JY., Etienne J., Vandenesch F., Dauwalder O., Bonnet JM., Junot S.; Gut and sublingual microvascular effect of esmolol during septic shock in a porcine model *Crit Care.* 2015 Jun 4;19:241. doi: 10.1186/s13054-015-0960-3.

50. Sanfilippo F., Santonocito C., Morelli A., Foex P.; Beta-blocker use in severe sepsis and septic shock: a systematic review *Curr Med Res Opin.* 2015;31(10):1817-25. doi: 10.1185/03007995.2015.1062357. Epub 2015 Aug 20.
51. Simonsen KA.; Early-Onset Neonatal Sepsis *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jan; 27(1): 21–47. doi: 10.1128/CMR.00031-13 PMID: PMC3910904
52. Nelson A., Berkestedt I., Schmidtchen A., Ljunggren L., Bodelsson M.; Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma *Shock.* 2008 Dec;30(6):623-7. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181777da3...
53. Ziegler T., Horstkotte J., Schwab C., Pfetsch V., Weinmann K., Dietzel S., Rohwedder I., Hinkel R., Gross L., Lee S., Hu J., Soehnlein O., Franz WM., Sperandio M., Pohl U., Thomas M., Weber C., Augustin HG., Fässler R., Deutsch U., Kupatt C.; Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis.. *J Clin Invest.* 2013 Jul 1. pii: 66549. doi: 10.1172/JCI66549.
54. Klink R., Papr HC., Kurtz A., Silbernagl S.; (2010) Physiologie Thieme Verlag S.194ff. ISBN-10: 313796007X
55. Karlsson S., Pettilä V., Tenhunen J., Lund V., Hovilehto S., Ruokonen E.; Finnsepsis Study Group Vascular endothelial growth factor in severe sepsis and septic shock *Anesth Analg;* 2008 Jun;106(6):1820-6 doi
56. Keßler M.;(2011) Die Bedeutung von S1P und Sphingosin für die Thrombozytenfunktion, On-line Bibliothek der Technische Universität München
57. Klöckl LU.; (2013) Charakterisierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivierung durch Sphingosin-1-Phosphat-Analoga, Universitätsbibliothek Berlin
58. Yatomi Y., Igarashi Y., Yang L., Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem.*, 1997. 121(5): p. 969-73.
59. Murata N., Sato K., Kon J., *et al.* Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 2000. 352 Pt 3: p. 809-15.
60. Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1582(1-3): p. 132-7.
61. Zhang *et al.* Sphingosine-1-Phosphate a novel lipid involved in Cell Proliferation *J Cell Biol.* 1991 Jul;114(1):155-67
62. Diab KJ., Adamowicz JJ., Kamocki K. *et al.*, Stimulation of sphingosine 1-phosphate signaling as an alveolar cell survival strategy in emphysema, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 181, no. 4, pp. 344–352, 2010.
63. Gomez-Muñoz A., Presa N., Gomez-Larrauri A., Rivera IG., Trueba M., Ordoñez M.; Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate *Prog Lipid Res.* 2016 Jan;61:51-62. doi: 10.1016/j.plipres.2015.09.002. Epub 2015 Dec 15..
64. Ghidoni R., Caretti A., Signorelli P. Role of Sphingolipids in the Pathobiology of Lung Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:487508. doi: 10.1155/2015/487508. Epub 2015 Dec 3.
65. Brinkmann V.; Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 115 (2007) 84–105
66. Michel M.C., Mulders A.C., Jongsma M., Alewijnse A.E., and Peters S.L.; Vascular effects of sphingolipids. *Acta Paediatr Suppl*, 2007. 96(455): p. 44-8

67. Byrne AM.; Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor or VEGF *J Cell Mol Med.* 2005 Oct-Dec;9(4):777-94.
68. Igarashi J., Michel T.; The Enigma of Sphingosine 1-Phosphate Synthesis A Novel Role for Endothelial Sphingosine Kinases *Circ Res.* 2008 Mar 28;102(6):630-2. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.173799.
69. Sanchez T<sup>1</sup>, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V, Claffey K, Hla T. Phosphorylation and Action of the Immunomodulator FTY720 Inhibits Vascular Endothelial Cell Growth Factor-induced Vascular Permeability *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):47281-90. Epub 2003, DOI 10.1074/jbc.M306896200
70. Engber D.; (2011) The Trouble with Black-6: A tiny alcoholic takes over the lab in Slate Magazine
71. Rittirsch D., Hoesel LM., Ward PA.; The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis *J Leukoc Biol January 2007 81:137-143*
72. Sugiyama A.; Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart *Cardiovascular Research 46 (2000) 119–125*
73. Singleton KD., Wischmeyer PE.; Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res.* 2003 Nov-Dec;35(6):486-91..
74. Kabay B., Kocaefe C., Baykal A., Ozden H., Baycu C., Oner Z., Özgüç M., Sayek I.; Interleukin-10 gene transfer: prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis *World J Surg.* 2007 Jan;31(1):105-15.
75. Bergers G., Song S.; The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005 Oct;7(4):452-64.
76. Hirschi KK., D'Amore PA.; Pericytes in the microvasculature *Cardiovasc Res.* 1996 Oct;32(4):687-98.
77. Nehls V., Drenckhahn D.; Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol.* 1991 Apr;113(1):147-54.
78. Bongiovanni D., Ziegler T., D'Almeida S., Zhang T., Ng JK., Dietzel S., Hinkel R., Kupatt C.; Thymosin  $\beta$ 4 attenuates microcirculatory and hemodynamic destabilization in sepsis. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15 Suppl 1:S203-10. doi: 10.1517/14712598.2015.1006193. Epub 2015 Jan 21.
79. Hinkel R.; 2009 Kardioprotektion nach Ischämie/Reperfusion durch embryonale endotheliale Progenitorzellen: Ergebnisse aus einem präklinischen Schweinemodell
80. Badamchian M., Fagarasan MO., Danner RL., Suffredini AF., Damavandy H., Goldstein AL.; Thymosin  $\beta$ 4 reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *Int Immunopharmacology* 2003 Aug;3(8):1225-33.
81. Díaz-Flores L., Gutiérrez R. Varela H., Rancel N., Valladares F.; Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol.* 1991 Apr;6(2):269-86.
82. Anisimov A., Tvorogov D., Alitalo A., Leppänen VM., An Y., Han EC., Orsenigo F., Gaál EI., Holopainen T., Koh YJ., Tammela T., Korpisalo P., Keskitalo S., Jeltsch M., Ylä-Herttuala S., Dejana E., Koh GY., Choi C., Saharinen P., Alitalo K.; Vascular Endothelial Growth Factor-Angiopoietin Chimera With Improved Properties for Therapeutic Angiogenesis *Circulation.* 2013;127:424-434
83. Sun Z., Li X., Massena S., Kutschera S., Padhan N., Gualandi L., Sundvold-Gjerstad V., Gustafsson K., Choy WW., Zang G., Quach M., Jansson L., Phillipson M., Abid MR., Spurkland A.,

- Claesson-Welsh L.; VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAd *J Exp Med*. 2012 Jul 2;209(7):1363-77. doi: 10.1084/jem.20111343. Epub 2012 Jun 11.
84. Ylä-Herttuala S., Rissanen TT., Vajanto I., Hartikainen JJ.; Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Am Coll Cardiol*. 2007 Mar 13;49(10):1015-26. Epub 2007 Feb 23...
  85. Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life Sci*. (2006) 63: 2067. doi:10.1007/s00018-006-6254-9
  86. Terashima J., Sampei S., Iidzuka M., Ohsakama A., Tachikawa C., Satoh J., Kudo K., Habano W., Ozawa S.; VEGF expression is regulated by HIF-1 $\alpha$  and ARNT in 3D KYSE-70, esophageal cancer cell spheroids. *Cell Biol Int*. 2016 Aug 20. doi: 10.1002/cbin.10656. [Epub ahead of print]
  87. Mohamed KM., Le A., Duong H., Wu Y., Zhang Q., Messadi DV.; Correlation between VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2004 Apr;76(2):143-52.
  88. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.; Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):843-5..
  89. Shimizu I., Aprahamian T., Kikuchi R., Shimizu A., Papanicolaou KN., MacLauchlan S., Maruyama S., Walsh K.; Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 2014 May;124(5):2099-112. doi: 10.1172/JCI71643. Epub 2014 Apr 8...
  90. Otrock K., Makarem JA., Shamseddine AI.; Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review *Zaher Blood Cells Mol Dis*. 2007 May-Jun;38(3):258-68. Epub 2007 Mar 6.
  91. Ferrara N.; Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):581-611.
  92. Ylä-Herttuala S., Rissanen TT., Vajanto I., Hartikainen J.; Vascular Endothelial Growth Factors Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine *J Am Coll Cardiol*. 2007 Mar 13;49(10):1015-26. Epub 2007 Feb 23.
  93. Karlsson S., Pettilä V., Tenhunen J., Lund V., Hovilehto S., Ruokonen E.; Finnsepsis Study Group Vascular endothelial growth factor in severe sepsis and septic shock. *Anesth Analg*. 2008 Jun;106(6):1820-6. doi: 10.1213/ane.0b013e31816a643f..
  94. Gordon EJ., Fukuhara D., Weström S., Padhan N., Sjöström EO., van Meeteren L., He L., Orsenigo F., Dejana E., Bentley K., Spurkland A., Claesson-Welsh L. The endothelial adaptor molecule TSAd is required for VEGF-induced angiogenic sprouting through junctional c-Src activation. *Sci Signal*. 2016 Jul 19;9(437):ra72. doi: 10.1126/scisignal.aad9256.
  95. Jung B., Obinata H., Galvani S., Mendelson K., Ding BS., Skoura A., Kinzel B., Brinkmann V., Rafii S., Evans T., Hla T.; O15Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development *Dev Cell*. 2012 September 11; 23(3): 600–610. doi:10.1016/j.devcel.2012.07.
  96. Roy H., Bhardwaja S., Ylä-Herttuala S.; Biology of vascular endothelial growth factors, *FEBS Letters* 580 (2006) 2879–2887
  97. Reines I.; (2009): Die Rolle des S1P in der Pathogenese allergisch entzündlicher Hauterkrankungen
  98. Puneet P., Yap CT., Wong L., Lam Y., Koh DR., Mochhala S., Pfeilschifter J., Huwiler A., Melendez AJ.; SphK1 Regulates Proinflammatory Responses Associated with Endotoxin and

Polymicrobial Sepsis **RETRACTED ARTICLE** Published 4 June 2010, *Science* 328, 1290 (2010)  
DOI: 10.1126/science.1188635

99. Schuchardt M, Tölle M, Prüfer J, van der Giet M.; Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *Br J Pharmacol.* 2011 Jul;163(6):1140-62. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01260.x.
100. Yatomi Y., Igarashi Y., Yang L., Hisano N., Qi R., Asazuma N., Satoh K., Ozaki Y., Kume S.; Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem.* 1997 May;121(5):969-73.
101. Hänel P<sup>1</sup>, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007 Apr;21(4):1202-9. Epub 2007 Jan 10.
102. Murata N., Sato K., Kon J., Tomura H., Yanagita M., Kuwabara A., Ui M., and Okajima F.; Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions *Biochem J.* 2000 Dec 15; 352(Pt 3): 809–815. PMCID: PMC1221521.
103. Książek M., Chacińska M., Chabowski A., and Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate *J Lipid Res.* 2015 Jul; 56(7): 1271–1281. doi: 10.1194/jlr.R059543 PMCID: PMC4479332
104. Fleischmann C., Thomas-Rueddel DO., Hartmann M., Hartog CS., Welte T., Heublein S., Dennler U., Reinhart K.; Hospital incidence and mortality rates- an analysis of hospital episode (DRG) statistics in Germany from 2007 to 2013. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 159-66. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159
105. Nofer JR., van der Giet M., Tolle M., *et al.*; HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P<sub>3</sub>. *J Clin Invest*, 2004. 113(4): p. 569-81.
106. Kimura T., Tomura H., Mogi C. *et al.*; Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal*, 2006. 18(6): p. 841-50.
107. Galvani S., Sanson M., Blaho VA., Swendeman SL., Obinata H., Conger H., Dahlbäck B., Kono M., Proia RL, Smith JD., Hla T.; HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P<sub>1</sub> to limit vascular inflammation. *Sci Signal.* 2015 Aug 11;8(389):ra79. doi: 10.1126/scisignal.aaa2581.
108. Wang W., Graeler MH., Goetzel EJ.; Physiological sphingosine 1-phosphate requirement for optimal activity of mouse CD4<sup>+</sup> regulatory T Cells. *FASEB J.* 2004 Jun;18(9):1043-5. Epub 2004 Apr 14.
109. Jaillard C., Harrison S., Stankoff B., Aigrot MS., Calver AR., Duddy G., Walsh FS., Pangalos MN., Arimura N., Kaibuchi K., Zalc B., Lubetzki C.; Edg8/S1P<sub>5</sub>: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005 Feb 9;25(6):1459-69.
110. Nishi T., Kobayashi N.; Hisano Y., Kawahara A., Yamaguchi A.; Review Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1841(5):759-65. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.07.012. Epub 2013 Aug 4.
111. Sukocheva O., Wadham C., Gamble J., Xia P.; Sphingosine-1-phosphate receptor 1 transmits estrogens' effects in endothelial cells. *Steroids.* 2015 Dec;104:237-45. doi: 10.1016/j.steroids.2015.10.009. Epub 2015 Oct 22.
112. Hagen N., Hans M., Hartmann D., Swandulla D., van Echten-Deckert G.; Sphingosine-1-phosphate links glycosphingolipid metabolism to neurodegeneration via a calpain-mediated

- mechanism. *Cell Death Differ.* 2011 Aug;18(8):1356-65. doi: 10.1038/cdd.2011.7. Epub 2011 Feb 18.
113. Hagen N., Van Veldhoven PP., Proia RL., Park H., Merrill AH Jr., van Echten-Deckert G.; Sub-cellular Origin of Sphingosine 1-Phosphate Is Essential for Its Toxic Effect in Lyase-deficient Neurons *J Biol Chem.* 2009 Apr 24; 284(17): 11346–11353. doi: 10.1074/jbc.M807336200 PMCID: PMC2670140
  114. Xia P., Wang L., Gamble JR., Vadas MA.; Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999 Nov 26;274(48):34499-505.
  115. Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R., *Duale Reihe Biochemie* 2008, Thieme Verlag, ISBN 978-3-13-125352-1
  116. Joy SV., Scates AC., Bearely S., Dar M., Taulien CA., Goebel JA., Cooney MJ.; Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann Pharmacother.* 2005 Oct;39(10):1693-9. Epub 2005 Sep 13.
  117. Gavard J.; Endothelial permeability and VE-cadherin A wacky comradeship *Cell Adh Migr.* 2014 Mar 1; 8(2): 158–164. Published online 2014 Apr 25. doi: 10.4161/cam.29026 PMCID: PMC4049861
  118. Richter JM., Schanbacher BL., Huang H., Xue J., Bauer JA., Giannone PJ.; Lipopolysaccharide Binding Protein Enables Intestinal Epithelial Restitution Despite Lipopolysaccharide Exposure *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 May; 54(5): 639–644. doi: 10.1097/MPG.0b013e31823a895a PMCID: PMC3288261 NIHMSID: NIHMS335732
  119. Daugherty A., Rateri D., Hong L., Balakrishnan A.; Measuring Blood Pressure in Mice using Volume Pressure Recording, a Tail-cuff Method. *J Vis Exp.* 2009 May 15;(27). pii: 1291. doi: 10.3791/1291.
  120. Rehberg M., Krombach F., Pohl U., Dietzel S.; Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy
  121. Ziegler T.; (2014) Mikrozirkulatorische und hämodynamische Veränderungen durch pan-endotheliale Angiopoietin-2 Überexpression.
  122. Landoni G., Biondi-Zoccai GG., Zangrillo A., Bignami E., D'Avolio S., Marchetti C., Calabrò MG., Fochi O., Guarracino F., Tritapepe L., De Hert S., Torri G.; Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007 Aug;21(4):502-11. Epub 2007 May 7.
  123. Carr MW., Roth SJ., Luther E., Rose SS., Springer TA., Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Apr 26; 91(9): 3652–3656. PMCID: PMC43639.
  124. Fan SL., Miller NS., Lee J., Remick DG.; Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta.* 2016 Sep 1;460:203-10. doi: 10.1016/j.cca.2016.07.002. Epub 2016 Jul 4.
  125. Jones SA.; Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6 *J Immunol* 2005;175:3463-3468
  126. Hurst SM., Wilkinson TS., McLoughlin RM., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller GM., Topley N., Jones SA.; Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001 14:705.-714.
  127. Onogawa, T. Local delivery of soluble interleukin-6 receptors to improve the outcome of  $\alpha$ -toxin producing *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Immunobiology* 209:651.-660.



128. Audi G., Bersillon O., Blachot J., Wapstra AH.; The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties *Nuclear Physics A*, 729, 2003, S. 3–128
129. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hyp/>
130. Herold G. *et al.* Innere Medizin 2013 Dr. Gerd Herold ISBN: 978-3-9814660-2-7
131. Peters M., Jacobs S., Ehlers M., Vollmer P., Müllberg J., Wolf E., Brem G., Meyer zum Büschenfelde KH., Rose-John S.; The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6 *J Exp Med.* 1996 Apr 1; 183(4): 1399–1406.
132. <http://ajph.aphapublications.org/doi/pdf/10.2105/AJPH.29.1.66>
133. Huang YL., Huang WP., Lee H.; Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. *World J Biol Chem.* 2011 Feb 26;2(2):25-34. doi: 10.4331/wjbc.v2.i2.25.
134. Spiegel S., Kolesnick R.; Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia.* 2002 Sep;16(9):1596-602
135. Maceyka M., Harikumar KB., Milstien S., Spiegel S.; Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 2012 Jan;22(1):50-60. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.003. Epub 2011 Oct 14.
136. Esmon CT.; Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S219-22
137. Hick C., Hick A.; (2006) *Intensivkurs Physiologie 5. Auflage Urban & Fischer*, Elsevier Verlag, ISBN-13: 978-3437418945
138. Zhao Y., Kalari SK., Usatyuk PV. *et al.*, Intracellular generation of sphingosine 1-phosphate in human lung endothelial cells: role of lipid phosphate phosphatase-1 and sphingosine kinase 1, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 19, pp. 14165–14177, 2007.
139. Abbasi T. and Garcia JGN., “Sphingolipids in lung endothelial biology and regulation of vascular integrity,” *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 216, pp. 201–226, 2013.
140. Ghosh TK., Bian J., Gill DL.; Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science.* 1990 Jun 29;248(4963):1653–1656.
141. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/m6000b.pdf>
142. [https://www.rndsystems.com/products/mouse-il-6-quantikine-elisa-kit\\_m6000b](https://www.rndsystems.com/products/mouse-il-6-quantikine-elisa-kit_m6000b)
143. <http://www.jleukbio.org/content/81/1/137.full>
144. Van Amersfoort ES., Van Berkel TJ., Kuiper J.; Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul;16(3):379-414.
145. Muta T., Takeshige K.; Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations *Eur J Biochem.* 2001 Aug;268(16):4580-9..
146. Olivera A., Spiegel S.; Sphingosine-1- Phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365,557-560 1993 October 1993 doi: 1,1038/365557a0
147. Chawla S., Rahar B., Saxena S.; S1P prophylaxis mitigates acute hypobaric hypoxia-induced molecular, biochemical, and metabolic disturbances: A preclinical report. *IUBMB Life.* 2016 May;68(5):365-75. doi: 10.1002/iub.1489. Epub 2016 Mar 9.
148. Hannun YA., Loomis CR., Merrill AH Jr., Bell RM.; Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem.* 1986 Sep 25;261(27):12604-9.

149. Wilson E., Olcott MC., Bell RM., Merrill AH Jr., Lambeth JD.; Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. *J Biol Chem.* 1986 Sep 25;261(27):12616-23.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Keimspektrum in Blutkulturen 1993-1994 nach <sup>7</sup> .....	9
Abbildung 2: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen nach Gastmeier und Geffers. <sup>6</sup> .....	10
Abbildung 3: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen nach NRZ .....	11
Abbildung 4: Diagnostische Kriterien des Multiorganversagens nach Werdan, K. <sup>7</sup> .....	13
Abbildung 5: Entwicklung eines MODS durch PAMPs und DAMPs nach Reinhart <sup>9</sup> .....	14
Abbildung 6: Der SOFA Score nach Singer <i>et al.</i> <sup>11</sup> .....	15
Abbildung 7: Transition vom angeborenen in das erworbene Immunsystem nach Jones SA., <sup>125</sup> .....	21
Abbildung 8: Überblick über die Funktionen des Tß4 nach Hinkel (2009) <sup>79</sup> .....	24
Abbildung 9: Ursprung der EC und PC nach Bergers <i>et al.</i> <sup>75</sup> .....	26
Abbildung 10: Funktionen verschiedener VEGF-Liganden nach Yla-Herttula S. <sup>84</sup> .....	28
Abbildung 11: Überblick über den VEGF Stoffwechsel des Endothels nach Yla-Herttula S. <sup>84</sup> .....	29
Abbildung 12: Neuropilinrezeptoren und VEGF- Stoffwechsel nach Orock K. <sup>90</sup> .....	31
Abbildung 13: Die VEGF-A Wirkung ist von der lokalen Konzentration abhängig nach Ylä-Herttuala <sup>92</sup>	31
Abbildung 14: Das VEGFR“-Tsad-c-SRC-Konstrukt nach Sun Z. <i>et al.</i> <sup>83</sup> .....	32
Abbildung 15: Das Tsad-Konstrukt als Mediator der Permeabilität nach Sun Z. <i>et al.</i> <sup>83</sup> .....	33
Abbildung 16: Partieller Antagonismus der VEGF induzierten Permeabilitätserhöhung durch S1P und seine Analoga nach Sanchez et al. <sup>69</sup> .....	33
Abbildung 17: Ausschnitt aus dem Sphingosinstoffwechsel nach Rosen, H. et al., 2009 Annu Rev Biochem.....	34
Abbildung 18: Speicherformen des S1P nach Schuchardt <i>et al.</i> <sup>99</sup> .....	36
Abbildung 19: S1P Fraktionen im Blutplasma nach Murata et al <sup>59</sup> und Okajima <i>et al.</i> <sup>60</sup> .....	37
Abbildung 20: Beeinflussung der S1P/SPH Verhältnisses durch Interleukin, VEGF und TNF-α nach Brinkmann V, <sup>65</sup> .....	38
Abbildung 21: Die Beeinflussung des S1P-Stoffwechsel ist bei vielen Krankheitsbildern von Bedeutung nach Spiegel <sup>135</sup> .....	39
Abbildung 22: Zusammenarbeit des Endothels mit den vSMC nach S1P <sub>1</sub> oder S1P <sub>3</sub> Aktivierung modifiziert nach Brinkmann <sup>56,65</sup> .....	43
Abbildung 23: S1P als Gegenspieler der Permeabilität nach Sanchez <sup>69</sup> .....	44
Abbildung 24: Übersicht der involvierten G-Proteine des S1P- Stoffwechsel modifiziert nach Brinkmann, V. <sup>65</sup> .....	45
Abbildung 25: LPS nach Amersfort <i>et al.</i> <sup>144</sup> .....	48
Abbildung 26: Beispiel einer nicht invasiven Blutdruckmessung anhand des Coda Systems .....	50
Abbildung 27: Echokardiographie des linken Ventrikels in der parasternalen Längsachse .....	53
Abbildung 28: Übersicht des Versuchsaufbaus .....	54
Abbildung 29: Immunfärbung des Muskels und des Herzens. Es werden spezifisch Perizyten und Endothelzellen gefärbt. ....	55
Abbildung 30: Übersichtsaufnahme: Färbung von VSMC und Endothelzellen .....	56
Abbildung 31: Die gemessene optische Dichte als Funktion der IL-6 Konzentration nach Anleitung von R&D Systems <sup>141</sup> .....	58
Abbildung 32: Relative mRNA-Spiegel der Adhäsionsmoleküle VE-und N-Cadherine im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen .....	69

Abbildung 33: Relative mRNA-Spiegel der Entzündungsmediatoren IL-6 und CCL2 Enzyme im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen .....	69
Abbildung 34: Relative mRNA-Spiegel der S1P-metabolisierenden Enzyme im Herzmuskel in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen .....	70
Abbildung 35: Relative mRNA-Spiegel der S1P-metabolisierenden Enzyme in der Niere in Abhängigkeit von den applizierten Substanzen .....	71
Abbildung 36: Prozentualer Gewichtsverlust als Funktion der Zeit nach Sepsisinduktion .....	72
Abbildung 37: Messung der Verhaltensveränderung als Funktion der Zeit.....	73
Abbildung 38: Der Gesamtscore, Summe aller Parameter als Funktion der Zeit nach LPS-Gabe.....	74
Abbildung 39: Ejektionsfraktionsverlust 12 Stunden nach Sepsisbeginn .....	75
Abbildung 40: Verlust des Fractional Shortenings 12 Stunden nach Sepsisinduktion.....	76
Abbildung 41: Wirkung der Sepsis auf die Herzfrequenz.....	76
Abbildung 42: Auswirkung der Sepsis auf das Schlagvolumen .....	77
Abbildung 43: Beeinflussung des Schlagvolumens durch die Sepsis .....	77
Abbildung 44: Die Quantifizierung der Permeabilität durch die extravasierte Flüssigkeit zeigt eine deutlichere vaskuläre Dysfunktion in den nicht behandelten Tieren .....	79
Abbildung 45: Perizyten im zeitlichen Verlauf der LPS –Sepsis. Hier ist die durch LPS induzierte Abnahme der Zellzahl genauso wie eine Erholungsphase in beiden Gruppen zu sehen.....	80
Abbildung 46: Endothelzellen im zeitlichen Verlauf der Sepsis .....	81
Abbildung 47: Perizyten im Skelettmuskel im zeitlichen Verlauf der Sepsis .....	82
Abbildung 48: Endothelzellen im zeitlichen Verlauf der Sepsis im Skelettmuskel.....	82
Abbildung 49: Der Perizytenverlust kann in der Sepsis durch S1P verringert werden (n=4x4) .....	84
Abbildung 50: Der Endothelzellverlust in der Sepsis kann durch S1P im Herzen und im Muskel reduziert werden (n=4) .....	84
Abbildung 51: Die Höhe des Quotienten zwischen Perizyten und Endothelzellen (PC/EC) und sein Stellenwert für die Integrität des Gefäßes. Bei dem Vergleich der Quotienten in den Muskeln behandelter und unbehandelter Mäuse wird ein Signifikanzniveau unter 0,05 erreicht.....	85
Abbildung 52: Mittlerer Arterieller Blutdruck in Abhängigkeit der Zeit nach Sepsisbeginn bei PBS oder SPH Gabe .....	86
Abbildung 53: MAP bei SPH Mäuse, Überlebende gegen nicht Überlebende.....	87
Abbildung 54: Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Zeit nach Sepsisinduktion.....	88
Abbildung 55: IL-6 Spiegel im zeitlichen Verlauf .....	90
Abbildung 56: FDG-Monozytenaktivität unter verschiedenen Substanzen, ohne Interleukin/TNF- $\alpha$ Stimulation (n=3).....	91
Abbildung 57: FDG-Monozytenaktivität unter verschiedenen Substanzen, mit Interleukin/TNF- $\alpha$ Stimulation (n=3).....	92
Abbildung 58: FDG Aktivität der Leukozyten ohne Monozyten unter Stimulation mit verschiedenen Substanzen, ohne Interleukin/TNF- $\alpha$ Stimulation (n=3) .....	93
Abbildung 59: FDG-Aktivität der Leukozyten ohne Monozyten unter Stimulation mit verschiedenen Substanzen, mit Interleukin/TNF- $\alpha$ Stimulation.....	94
Abbildung 60: Die Angriffspunkte des SPH in der Sepsis sind die ersten drei Punkte des Teufelkreises .....	103
Abbildung 61: Das steigende wissenschaftliche Interesse an S1P nach Pubmed .....	110

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursprungsorgane nosokomialer Infektionen, modifiziert nach Gastmeier und Geffers. <sup>6</sup> ...	10
Tabelle 2: Relativer Anteil ausgewählter nosokomialer Infektionen .....	11
Tabelle 3: Ursachen eines Multiorganversagens (MODS) .....	12
Tabelle 4: Einige Substanzen und ihre Permeabilität modifiziert nach Hick C., S.97ff. <sup>136</sup> .....	27
<b>Tabelle 5: VEGF und Angiopoietine: Liganden und Rezeptoren modifiziert nach Anisimov <i>et al.</i> <sup>82,83</sup></b> .....	30
Tabelle 6: Übersicht der S1P Rezeptoren, modifiziert nach Brinkmann <sup>56,65</sup> .....	40
Tabelle 7: Auswahl wichtiger und möglicher Funktionen der S1P <sub>1</sub> , S1P <sub>2</sub> und S1P <sub>3</sub> Rezeptoren, modifiziert nach Brinkmann <sup>65</sup> .....	41
Tabelle 8: Affinitäten des FTY 720-P nach Brinkmann <sup>65</sup> .....	45
Tabelle 9: Sepsis-severity Score .....	49
Tabelle 10: Regressionsmöglichkeiten für die Modellisierung der IL-6-ELISA-Konzentration .....	59
Tabelle 11: Zusammensetzung der verschiedenen Medien der Leukozytenkultur .....	61
Tabelle 12: Verwendete Antikörper .....	66

# Anhang

## Blutdruckmessung mit Coda (23.05.2013)

Blutdruckmessgerät: CODA 2 von Kent Scientific Corporation

Maus in Röhre so fixieren, dass der komplette Schwanz hinten rausschaut und nicht zurückgezogen werden kann

Röhre mit Maus auf Wärmeplatte legen (kurze Zeit bevor die Messung beginnt wegen Temperatur-adaption)

Programm: Coda 6 v2.5

Diagnostics -> Check Cuffs -> Channel 1 markieren -> Test

Wenn % Drop < 10 -> Close (falls % Drop > 10 Cuffs auswechseln)

Begin a new experiment -> Experiment auswählen -> OK

Session name eingeben, Number of cycles: 10, Seconds between cycles: 1 -> OK

Add specimens -> Maus aus Liste auswählen -> auf Rechtspfeil klicken -> Holder: was ausgewählt wurde -> Next

Minimum volume value: 0

Cuffs am Schwanz der Maus so anbringen, dass sie aneinander anschließen: O-Cuff (klein) zuerst, danach VPR-Cuff (groß)

Auf Start klicken

10 Durchläufe der Blutdruckmessung abwarten

Ergebnisse erscheinen in Tabelle -> in Excel-Tabelle kopieren

## Pecam NG<sub>2</sub> Färbung

1. Thaw sections for 10 to 15 min at room temperature (RT), only when sections were frozen
2. Fixate slides in Aceton 4°C for 10-15 min
3. (optional washing in PBS 3x10min in PBS)
4. Cycle organ sections with liquid blocker (Dako pen) Caution: Do not use pen on wet slides, use paper towels to remove excess PBS, but organsections should not be dry too long since staining results might worsen. In addition, do not use the Pen on tissue tag.
5. Incubate for 30 min with blocking solution (2%BSA 0,2% Triton-x-100 in PBS)
6. Incubate with primary antibody (anti Pecam antibody) 1:200 (in PBS) in blocking solution at 4°C over night
7. Wash in PBS (3x10 min)
8. Incubate with secondary antibody 1:200 ( in antibody diluent) for 2 h at room temperature ( Donkey anti rat Cy3-affini pure 712-165-153 = red anti pecam AB)
9. Wash in PBS 3x10 min

10. Incubate with second primary antibody 1:200 in antibody diluent at 4°C over night (Anti NG<sub>2</sub> chondroitin (rabbit) -20°C)
11. Wash in PBS 3x10 min
12. Incubate with second primary antibody 1:200 in antibody diluent for 2 h at room temperature (Alexa 488 Invitrogen Anti Rabbit IgG H+L origin goat, 982425)
13. Wash in PBS 3x10 min
14. Mount with Vectashield DAPI
15. Take pictures or store at 4°C

### **Mouse: Pecam/SMA (smooth muscle antigen) Färbung**

1. Thaw sections for 10 to 15 min at room temperature (RT), only when sections were frozen
2. Fixate slides in Aceton 4°C for 10-15 min
3. (optional washing in PBS 3x10min in PBS)
4. Cycle organ sections with liquid blocker (Dako pen) Caution: Do not use pen on wet slides, use paper towels to remove excess PBS, but organsections should not be dry too long since staining results might worsen. In addition, do not use the Pen on tissue tag.
5. Incubate for 30 min with blocking solution (2%BSA 0,2% Triton-x-100 in PBS)
6. Incubate with primary antibody (anti Pecam antibody) 1:200 (in PBS) in blocking solution at 4°C over night
7. Wash in PBS (3x10 min)
8. Incubate with secondary antibody 1:200 (in antibody diluent) for 2 h at room temperature (goat anti rat= green anti pecam AB)
9. Wash in PBS 3x10 min
10. Incubate with red labeled primary antibody 1:200 in antibody diluent at 4°C over night or room temperature for 2 h (no secondary antibody needed since it is a anti mouse-mouse antibody which is fluorescent)
11. Wash in PBS 3x10 min
12. Mount with Vectashield DAPI
13. Take pictures or store at 4°C

## Protokoll für den IL-6 ELISA (Auszug R&d Systems)

Refer to the product for complete assay procedure.

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples, standards, and controls be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, standard dilutions, and samples as directed in the product insert.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 100  $\mu$ L of Assay Diluent to each well.
4. Add 100  $\mu$ L of Standard, control, or sample to each well. Cover with a plate sealer, and incubate at room temperature for 2 hours.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process 3 times for a total of 4 washes.
6. Add 200  $\mu$ L of Conjugate to each well. Cover with a new plate sealer, and incubate at room temperature for 2 hours.
7. Aspirate and wash 4 times.
8. Add 200  $\mu$ L Substrate Solution to each well. Incubate at room temperature for 20 minutes. PROTECT FROM LIGHT.
9. Add 50  $\mu$ L of Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 minutes. Set wavelength correction to 540 nm or 570 nm.



# Danksagung

Zuallerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Herr Professor Christian Kupatt** für die Gelegenheit bedanken an einem so spannenden und vielseitigen Thema für meine Dissertation arbeiten zu dürfen. Die von seinem Labor zur Verfügung gestellten Mäuse, das Material und die von seinem Labor etablierten Methoden waren der Schlüssel zur Erstellung dieser Arbeit. Desweiteren waren die Kongresse, die Diskussionen und die Auseinandersetzung mit diesem oder anderen Themen dieses Labors sehr hilfreich für die wissenschaftliche Problemanalyse und Meinungsbildung.

Zusätzlich gilt ein besonderer Dank meinem Betreuer **Herr Dr. Tilman Ziegler**, meiner Vordoktorandin **Frau Dr. Karolina Weinmann** und meiner Laborleiterin **Frau Dr. Rabea Hinkel**, die mich eingelernt haben, immer produktive und konstruktive Ideen an den Tag legten und die sehr großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem gesamten Labor bedanken, Insbesondere die Expertise der technischen Assistenten **Cuong Kieu** und **Elisabeth Raatz** haben mir das Beenden dieser Arbeit besonders erleichtert.

Außerhalb meines Labors will ich auch meinen Freunden und Mentoren, vor allem **Frau Franziska Hanus**, **Frau Pia Keseberg**, **Frau Katherina Werchoturov** und **Frau Dr. Christina Grosse** für ihre moralische Unterstützung in sehr schweren Zeiten danken. Ein zusätzlicher Dank gilt Frau Hanus des Weiteren für die Hilfe bei der Etablierung der FDG-Messung nach MACS.

Ich würde mich auch gerne bei meiner Universität, der **Ludwig-Maximilian-Universität** für die Gelegenheit eine medizinische Ausbildung genießen zu dürfen und vor allem Finanzierung des Forschungsprogramms „FoeFoLe“ bedanken.

Schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie. Meinem Bruder **Sidney d' Almeida**, meiner Mutter **Dr. Brigitte Gnamien-d'Almeida** und meinem Vater **Dr. Guillaume d'Almeida** möchte ich neben der moralischen Unterstützung für das Vorzeichnen einer wissenschaftlichen Karriere danken, die es mir ungemein erleichtert hat, denselben Weg einzuschlagen.

## Eidesstattliche Versicherung

d'Almeida, Sascha

Name, Vorname

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Sphingosin als potentielle Prophylaxe im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.12.17

Name, Vorname

---

d'Almeida, Sascha

Unterschrift

---